



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CAGLIARI

FACOLTÀ DI INGEGNERIA E ARCHITETTURA

CORSO DI DOTTORATO IN INGEGNERIA BIOMEDICA

XXVII ciclo

ING-IND/34, ING-IND/22

**Sviluppo e caratterizzazione di materiali innovativi a base di
idrossiapatite e vetro bioattivo**

Relatore:

Prof. Ing. Roberto Orrù

Tesi di Dottorato di:

Alessio Cuccu

Coordinatore:

Prof. Ing. Giacomo Cao

ANNO ACCADEMICO 2013/2014

INDICE

PREFAZIONE

Pag. 1

1. INTRODUZIONE

Pag.8

1.1 Bioceramici

1.1.1 Bioceramici a base di idrossiapatite

1.1.2 Bioceramici a base di biovetri

1.2 LA SINTERIZZAZIONE

1.2.1 Sinterizzazione viscosa

1.2.2 Sinterizzazione con fase liquida

1.2.3 Sinterizzazione allo stato solido

1.3 TECNICHE DI SINTERIZZAZIONE

1.3.2Tecnologia di sinterizzazione SPS

CAPITOLO 2: Sinterizzazione di polveri di idrossiapatite

Pag. 37

2.1 INTRODUZIONE

2.2 PARTE SPERIMENTALE

2.3 RISULTATI E DISCUSSIONE

2.3.1 Caratterizzazione delle polveri iniziali

2.3.2 Densificazione delle polveri tramite tecnica SPS

2.3.3 Caratterizzazioni Meccaniche

CAPITOLO 3: Sinterizzazione di polveri di vetri bioattivi

Pag. 74

3.1 INTRODUZIONE

3.2 PARTE SPERIMENTALE

3.3 RISULTATI E DISCUSSIONE

3.3.1 Caratterizzazione delle polveri iniziali

3.3.2 Densificazione delle polveri tramite tecnica SPS

3.3.3 Caratterizzazioni Meccaniche

CAPITO 4: Caratterizzazione biologica dei sinterizzati a base di idrossiapatite

Pag. 104

4.1 Biocompatibilità

4.2 Test Alamarblue[®]

4.3 Risultati della caratterizzazione biologica

CAPITO 5: Conclusioni

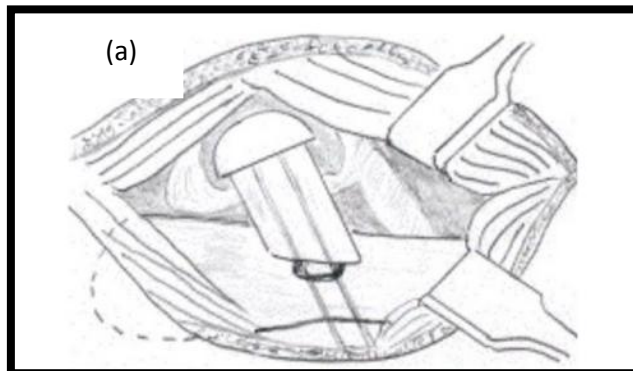
Pag.121

Riferimenti Bibliografici

Pag.126

Prefazione

Il presente lavoro, svolto presso il Dipartimento di Ingegneria Chimica e dei Materiali dell'Università di Cagliari, fa parte di un progetto di studio e realizzazione di materiali ceramici innovativi a base di idrossiapatite e vetro bioattivo. L'interesse verso questa particolare famiglia di materiali è sostenuto dalla loro caratteristica principale, ormai conosciuta da oltre quarant'anni; la compatibilità con i tessuti viventi. Da secoli l'uomo si impegna per individuare e produrre dei materiali che permettano di realizzare delle protesi che abbiano lo scopo di sostituire o supportare delle mancanze di tessuto (soprattutto osseo) causate da patologie specifiche, invecchiamento e cause accidentali. Nella **Figura 1 (a – b)** sono illustrati due esempi di vecchi studi, fatti sulle protesi d'anca, che testimoniano l'interesse già da allora verso i campi applicativi delle protesi ossee.



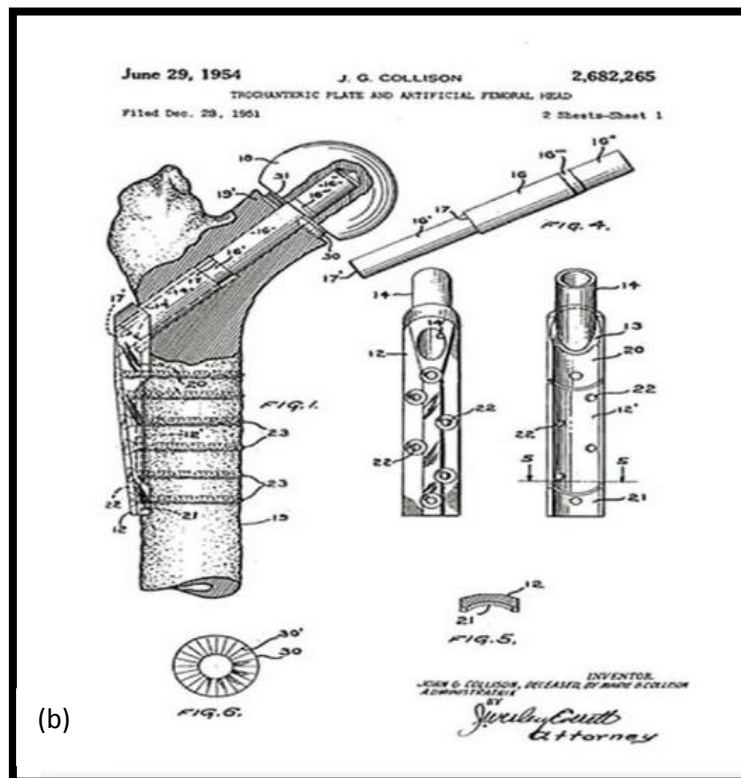


Figura 1 (a). Disegno del 1890 che riporta un esempio di protesi d'anca; brevetto per protesi d'anca Marie B. Collinson 1951 **(b)** [<http://www.maitrise-orthopedique.com>]

Problemi degenerativi e infiammatori, che colpiscono milioni di persone in tutto il mondo, rappresentano, nei paesi sviluppati, la metà di tutte le malattie croniche di persone con oltre 50 anni di età e si prevede che tale percentuale aumenti con l'aumentare dell'età media. Queste patologie richiedono spesso un intervento chirurgico, nella maggior parte dei casi è necessaria la sostituzione totale o parziale dell'articolazione se presente un grave deterioramento. Inoltre, i numerosi casi di fratture ossee, lombalgia, osteoporosi, scoliosi e altri problemi muscolari e ossei, vengono risolti mediante impianti permanenti, temporanei o biodegradabili. Questa è stata l'esigenza che ha portato la ricerca verso nuovi tipi di materiali, da poter utilizzare in una vasta gamma di casi.

Inizialmente l'attenzione è stata focalizzata verso i materiali che erano resi disponibili da altri ambiti applicativi come quello dell'ingegneria industriale, chimica e dell'energia; un esempio è riportato in **Figura 2**.

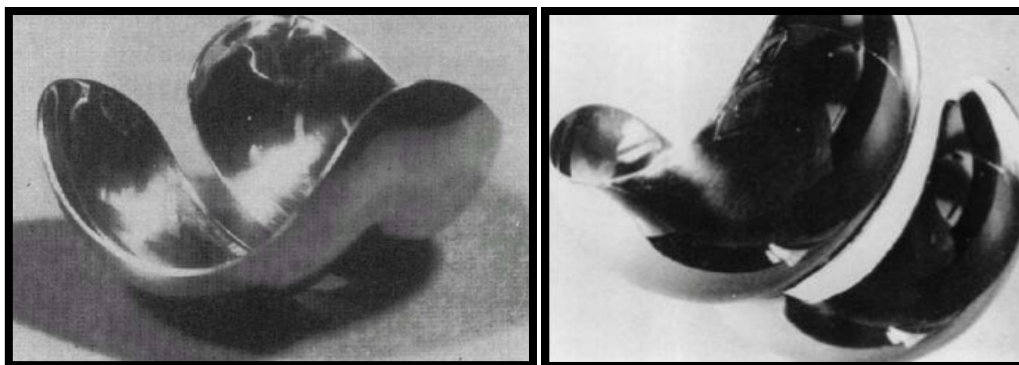


Figura 2. Componente femorale in Vitallium (Smith-Peterson 1940) – componente protesi ginocchio Acciaio Inox (Platt 1955)

Era già ben chiaro come l'ambiente costituito dal corpo umano fosse altamente corrosivo e aggressivo verso il materiale impiantato, e pertanto dovevano essere presi in considerazione dei materiali con proprietà adatte allo scopo. A tal riguardo risulta fondamentale l'inerzia chimica del materiale; infatti quest'ultimo deve avere come caratteristica principale quella di resistere all'attacco da parte dei tessuti e dei fluidi, non rilasciando particelle o ioni dannosi. Le proprietà del materiale dal punto di vista biologico acquisirono un ruolo fondamentale nella determinazione dell'adeguatezza di un impiego in campo biomedico quindi in questo modo presero piede i primi metodi standardizzati di studio della biocompatibilità, che fornivano un metro di giudizio per valutare dal punto di vista quantitativo il comportamento del supporto in certe condizioni

prestabilite. I materiali che possedevano questi requisiti entrarono a far parte della categoria dei biomateriali. Questi, pur essendo inerti, venivano isolati dal resto dell'organismo. Questo problema insieme alla fragilità delle superfici spinse la ricerca verso una soluzione come la fissazione biologica. Creazione di supporti porosi che permettessero la crescita dell'osso e dei tessuti negli spazi vuoti. A cavallo tra anni 50 e 60 venne introdotta una nuova classe di materiali, che una volta impiantati, rispondevano attivamente determinando una fissazione bioattiva, grazie alla loro composizione chimica. In sostanza a seguito dell'interazione con il tessuto e i fluidi, si creava un vero e proprio legame con l'impianto. Si può affermare che la classe dei bioceramici per eccellenza nacque nell'ambito di questa fase di ricerca. Il nome che identifica questa classe di materiali non indica un'origine che si può definire biologica, ma si riferisce alla caratteristica di biocompatibilità. Essi trovano ampia applicazione in vari settori dall'odontoiatria fino all'ortopedia ed al settore cardiovascolare avanzato.

Il concetto di biomateriale è cambiato nel tempo, si è avuta un'evoluzione soprattutto in base alle caratteristiche distintive del materiale; ad oggi infatti è possibile dividerli in tre diverse generazioni. La caratteristica comune alla maggior parte dei biomateriali di prima generazione è la loro "inerzia chimica", ossia il fatto di non scatenare una risposta di tipo negativo nell'organismo ospitante, comportandosi da materiale inerte nell'ambiente biologico nel quale viene inserito. Il principio biologico alla base dello sviluppo di biomateriali era di ridurre al minimo la risposta immunitaria, e questo è ancora valido oltre 20 anni dopo **[Larry L. Hench Julia M. Polak et al., 2002]**. Successivamente, gli studi sui biomateriali cominciarono a focalizzarsi, piuttosto che verso il raggiungimento esclusivamente di una risposta tissutale bioinerte, sulla produzione di componenti

bioattivi in grado di suscitare un'azione controllata in ambiente fisiologico [Larry L. Hench, Julia M. Polak et al., 2002]. Nella terza generazione di biomateriali sono stati sviluppati i vetri bioattivi e le schiume macroporose, allo scopo di attivare i geni che stimolano la rigenerazione dei tessuti viventi [Larry L. Hench Julia M. Polak et al., 2002]. In definitiva è possibile riassumere e definire i biomateriali come ogni sostanza o combinazione di sostanze, diversa da farmaco, sia di origine sintetica o naturale, che può essere impiegata per qualsiasi periodo di tempo e che può essere utilizzato come supporto o sostituto di un tessuto. Il biomateriale ai nostri giorni può avere diverse caratteristiche che lo rendono diverso in base all'applicazione per la quale è stato progettato e creato. La caratteristica imprescindibile tra le altre caratterizzanti, è la biocompatibilità. Definita come "capacità di un materiale di determinare, da parte di un sistema vivente, una favorevole reazione alla sua presenza in una specifica applicazione".

Tra le altre caratteristiche troviamo la biodegradabilità e bioassorbimento; per quanto riguarda la biodegradabilità si può intendere come il progressivo disgregamento del materiale per mezzo dell'avanzamento delle attività biologiche. Il bioassorbimento invece è un processo di dissoluzione o rimozione dovuto all'attività cellulare del materiale, inserito in un ambiente biologico.

I biomateriali di nuovissima generazione sono in grado di essere completamente riassorbiti, diventando cioè parte integrante e indistinguibile del tessuto vivo che li circonda; inoltre essi rilasciano specie chimiche che possono fungere da stimolo per la proliferazione cellulare e la successiva differenziazione.

Nell'ambito dei materiali ceramici bioattivi quelli a base di fosfati di calcio, in particolare l'idrossiapatite, e i vetri bioattivi rivestono un ruolo rilevante. Tuttavia, sebbene queste tipologie di biomateriali vengono già attualmente impiegati in vari ambiti della medicina, esistono ancora diverse criticità e aspetti non del tutto chiariti nei loro riguardi.

Per esempio, la realizzazione di impianti di tipo massivo a partire da polveri di idrossiapatite e/o biovetri, non è un obiettivo di facile raggiungimento. Infatti a seconda delle condizioni operative adottate durante il consolidamento delle polveri (sinterizzazione), le loro caratteristiche compositive e strutturali, che a loro volta determinano quelle meccaniche e biologiche, possono venire modificate durante il processo. In tale contesto risulta fondamentale non solo la scelta dei materiali di partenza ma anche identificare delle tecnologie di sinterizzazione particolarmente efficienti.

Il presente lavoro di tesi si inserisce proprio in questo ambito. Nello specifico, verranno esaminate diverse tipologie di polveri commerciali di idrossiapatite allo scopo di identificare quella che presenta maggiore stabilità termica.

Relativamente ai biovetri, verranno confrontati il comportamento di una nuova tipologia di vetri bioattivi rispetto al classico **Bioglass® 45S5**, sviluppato da Hench e attualmente il più utilizzato in campo biomedico.

Per quanto concerne il consolidamento delle polveri si farà ricorso alla tecnologia innovativa “Spark Plasma Sintering” che ci si aspetta consenta di operare in condizioni relativamente più vantaggiose (minori temperature) rispetto alla tecniche consuete di compattazione a caldo.

Questo limiterebbe i fenomeni di decomposizione delle polveri di idrossiapatite e la cristallizzazione dei biovetri. I prodotti finali vengono confrontati in termini di proprietà meccaniche e verranno condotti degli studi per valutarne la relativa risposta biologica.

Capitolo 1

Introduzione

1.1 I BIOCERAMICI

Prima di entrare nell'ambito della classe dei materiali bioceramici, occorre far riferimento a quella più generale dei biomateriali. Come indicato durante il VI Simposio annuale internazionale sui Biomateriali nel 1974 si definisce biomateriale una *“sostanza sistematicamente e farmacologicamente inerte, designata per l'impianto all'interno di tessuti viventi o per l'incorporazione con essi”*. Di fatto la definizione di biomateriale precedentemente riportata esclude che si tratti di tessuto vivente, per il quale si parla di trapianto e non di impianto.

Tuttavia, nella definizione precedente, non si fa riferimento al fatto che il biomateriale si interfacci direttamente con il tessuto vivente.

La definizione di biomateriale ha subito vari cambiamenti negli anni fino a quando si è arrivati ad una definizione che rendesse una descrizione più elastica e meno ambigua di questa classe di materiali. Al Consensus Development Conference nel 1986, svoltosi a Chester, venne data la seguente definizione *“una sostanza non vivente, utilizzata nella fabbricazione di un dispositivo medico che ha in qualche punto un'interfaccia con un tessuto vivente”*.

È necessario quindi un contatto tra biomateriale e tessuto dell'organismo ricevente. Se deve essere presente un contatto, più o meno intimo, tra biomateriale ed organismo, la ‘convivenza’ di questi è la base della sopravvivenza di qualsiasi protesi o manufatto. Il materiale deve essere compatibile con l'ambiente in cui viene inserito. Un materiale è compatibile se, inserito in un tessuto ospite, non induce effetti avversi significativi e nemmeno ne subisce [Williams, 1982].

In questo ambito i bioceramici rappresentano semplicemente quella fascia di biomateriali che ha composizione e struttura tipici dei materiali ceramici.

I bioceramici si suddividono in bioinerti e bioattivi. I primi, per esempio Al_2O_3 , TiO_2 etc. non inducono alcuna risposta a valle del contatto con l'organismo vivente. Viceversa, quando i ceramici bioattivi vengono interfacciati con il tessuto biologico quest'ultimo manifesta una risposta positiva al corpo estraneo. In quest'ultima categoria di bioceramici rientrano l'idrossiapatite e i biovetri, che sono l'oggetto dei prossimi paragrafi e capitoli.

1.1.1 Bioceramici a base di idrossiapatite

L'idrossiapatite (**HAp**) fa parte della classe delle apatiti, ha formula generale $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ anche se spesso viene indicata come $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ in quanto la cella elementare del cristallo è costituita da due molecole. In base alla sostituzione anionica si può avere un vasto intervallo di soluzioni solide. Questo composto è presente in natura, ma può essere prodotto anche artificialmente.

Le apatiti hanno una formula chimica generale $M_{10}^{2+}(XO_4^{3-})_6Z_2^-$ e sono frequentemente nonstechiometriche. Gli ioni M^{2+} sono cationi a doppia carica come Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} , Pb^{2+} e Cd^{2+} . Gli anioni XO_4^{3-} possono essere PO_4^{3-} , AsO_4^{3-} , VO_4^{3-} , CrO_4^{3-} , e MnO_4^{3-} , mentre quelli monovalenti Z^- , si presentano come F^- , OH^- , Br^- , e ioni Cl^- .

La neutralità della struttura cristallina è conservata da due modifiche che possono avvenire simultaneamente. In **Figura 3** è riportato il modello cristallografico della struttura dell'idrossiapatite.

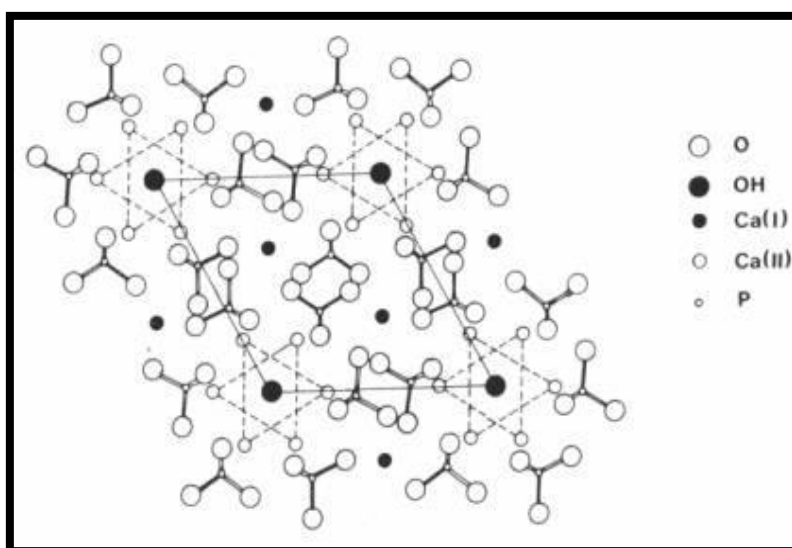


Figura 3. Esempio della cella elementare della struttura cristallina di **HAp**

Sebbene la struttura sopra descritta dell'idrossiapatite è stata usata per molto tempo come modello idealizzato per quella dell'apatite biologica, ci sono differenze significative nella relativa cristallografia e composizione. Similmente, differenze strutturali e di composizione possono risultare tra l'apatite ideale e l'idrossiapatite sintetica. Queste diversità possono derivare dal processo produttivo. Allo scopo di una miglior comprensione dei cambiamenti nella struttura e nelle

proprietà di questi materiali è opportuno considerare alcune proprietà strutturali dell'apatite biologica. Sebbene sia un minerale abbastanza raro, l'idrossiapatite costituisce il maggiore componente delle ossa. Infatti il 99% del calcio presente nell'organismo umano è immagazzinato nel tessuto osseo sotto forma di idrossiapatite. A tal riguardo in **Figura 4** è riportata la composizione del tessuto osseo.

MINERAL CONSTITUTION OF HARD TISSUES				
Element	Dental tissues			Bone
	Enamel	Dentine	Cement	
Calcium	36.1	35	35.5	26.7
Phosphorus	17.3	17.1	17.1	12.47 (expressed as PO_4^{3-})
CO_2	3.0	4.0	4.4	3.48 (expressed as CO_3^{2-})
Mg	0.5	1.2	0.9	0.436
Na	0.2	0.2	1.1	0.731
K	0.3	0.07	0.1	0.055
Cl	0.3	0.03	0.1	0.08
F	0.016	0.017	0.015	0.07
S	0.1	0.2	0.6	—
Cu	0.01	—	—	—
Si	0.003	—	0.04	—
Fe	0.0025	—	0.09	—
Zn	0.016	0.018	—	—

Figura 4. Composizione dei principali tipi di tessuti duri umani

L'idrossiapatite è inoltre presente nello smalto dei denti, che rappresenta il tessuto più duro del corpo umano. Lo smalto è costituito infatti per circa il 96% da idrossiapatite, dall'1% da matrice organica e dal 3% da acqua. La carenza di idrossiapatite può portare allo sviluppo di alcune patologie, quali, l'**osteoporosi**, malattia che colpisce nello specifico molte donne in età post-menopausale che porta a una maggiore fragilità delle ossa con conseguente rischio di fratture.

In **Figura 5** è illustrato un esempio di struttura del tessuto osseo umano.

Nei denti, in condizioni normali, l'idrossiapatite presente nello smalto e nella dentina, è organizzata in strutture aventi alta densità con conseguente durezza e resistenza che costituiscono i presupposti per mantenere l'integrità del dente.

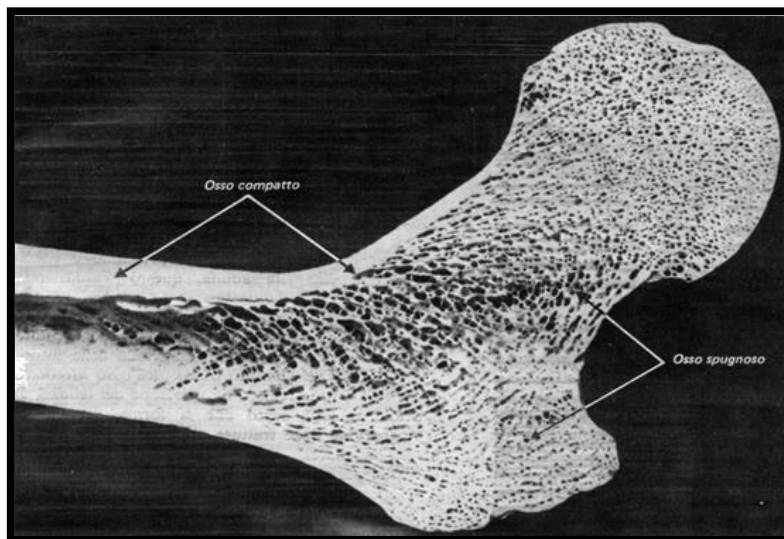


Figura 5. Esempio della struttura compatta e porosa del tessuto osseo umano

Sulla base di quanto detto è chiaro che l'idrossiapatite, e i calcio fosfati in generale, rivestano un ruolo importante nella famiglia dei bioceramici. Essi si differenziano per un diverso rapporto **Ca/P**; e mostrano ottime caratteristiche di bioattività e osteoconduttività. Tali biomateriali sono attualmente utilizzati in diverse applicazioni biomediche quali impianti dentali, guarigione di difetti ossei, trattamento di fratture e sostituzione totale di articolazioni, ricostruzione del cranio e maxillo-facciale, otorinolaringoiatria e chirurgia spinale, rivestimenti per migliorare la biocompatibilità d'impianti metallici, etc. [Hench, 1991; Cao et al., 1996; Hench, 1998].

Il fatto che l'idrossiapatite costituisca la maggior parte della fase inorganica dei tessuti ossei e dentali dei mammiferi rappresenta il presupposto per il suo utilizzo come materiale sostitutivo dell'osso [Lowenstam, Weiner., 1989; Hench, 1991; Weiner, Wagner, 1998; Dorozhkin, 2010; Dorozhkin, 2007].

Per un loro impiego in ambito biomedico, l'idrossiapatite e gli altri calcio fosfati devono poter essere ottenuti per via sintetica [Ruiz-Hitzky et al., 2008]. A tal riguardo, l'idrossiapatite sintetica è testata per fini applicativi legati alla rigenerazione dell'osso. È stato riscontrato come questa non comporta problemi di biocompatibilità e presenta caratteristiche meccaniche che la rendono adatta a fungere da supporto alla matrice polimerica. Inoltre è possibile modularne la degradabilità controllando la cristallinità e variando i parametri del processo di sintesi. I calcio fosfati in vivo mostrano un comportamento bioattivo dato dall'interazione superficiale con i gruppi NH_3^+ e COO^- di proteine come la fibronectina e vitronectina.

Inoltre, i calcio fosfati interagiscono con le integrine nel mediare l'adesione di osteoblasti e cellule mesenchimali. Possono essere usati anche come riepitivi grazie all'elevato rapporto superficie/volume che favorisce l'interazione. Questo porta ad un intimo legame fisico tra gli impianti e l'osso, definito osteointegrazione [Ong e Chan, 1999].

1.1.2 Bioceramici a base di Biovetri

I biovetri appartengono ad una sottofamiglia di vetri e presentano una composizione particolare, che venne messa a punto dal L. Hench[**Hench, 2006**]. Nello specifico il suo interesse verso il tema dell'interazione tra materiali d'impianto e corpo umano ebbe inizio nel 1957 a seguito di informazioni che riguardavano ciò che accadeva in Vietnam. Infatti molti soldati erano sottoposti ad amputazioni perché gli impianti con i quali venivano trattati si dimostravano non adatti e nella maggior parte dei casi il loro organismo li rigettava, da cui la necessità di amputare l'arto. Si poneva dunque il problema di formulare e sviluppare una famiglia di materiali che fossero in grado di interagire e legarsi ai tessuti viventi, invece che formare tessuti cicatriziali.

Un materiale con queste caratteristiche doveva essere forzatamente formato dagli stessi costituenti delle ossa. Partì da questo spunto lo studio di Hench per produrre un nuovo materiale che a seguito dell'interazione con i tessuti organici formasse uno strato di idrossiapatite presente naturalmente nelle ossa. Dopo qualche anno di indagine in tale ambito arrivò a formulare il primo biovetro, che egli chiamò **45S5**, la cui composizione prevedeva : **45% SiO₂ – 24,5% Na₂O – 24,5% CaO – 6% P₂O₅**, dove le percentuali sono espresse in peso; furono eseguiti dei test in vivo per verificare la formazione dello strato di idrossiapatite sulla superficie dell'impianto. Con i successivi test in vitro si capì che quella composizione quando entrava in contatto con fluidi corporei era in grado di far precipitare sulla superficie del biovetro uno strato di idrossiapatite carbonata (**HCA**).

Tale strato di cristalli di idrossiapatite, perfettamente compatibile con l'osso umano, si legava saldamente ad esso attraverso fibrille di collagene. Così ebbe inizio l'importante utilizzo dei biovetri in campo biomedicale. Inizialmente sembrava che il legame potesse aver luogo solo tra

materiale e tessuto duro. Invece successivamente, nel 1981, il dottor June Wilson scoprì la possibilità di indurre il legame anche con i tessuti molli e questo avvenimento decretò le basi per le prime applicazioni del **Bioglass®**. Ci furono poi degli ulteriori studi che misero in evidenza l'importanza della composizione per la formazione dello strato di idrossiapatite, per la quale sia necessaria una velocità di reazione elevata tra vetro e ambiente biologico. In **Figura 6** sono riportate le composizioni di biovetro che sono in grado di generare un legame sia con i tessuti duri che con quelli molli. Questa rappresentazione vale per vetri aventi tutti il 6% in peso di P_2O_5 e quantità variabili di SiO_2 , CaO e Na_2O . In particolare, si può assumere come nella regione A si ottiene il legame con l'osso, mentre solo nella zona S si può formare anche con i tessuti molli.

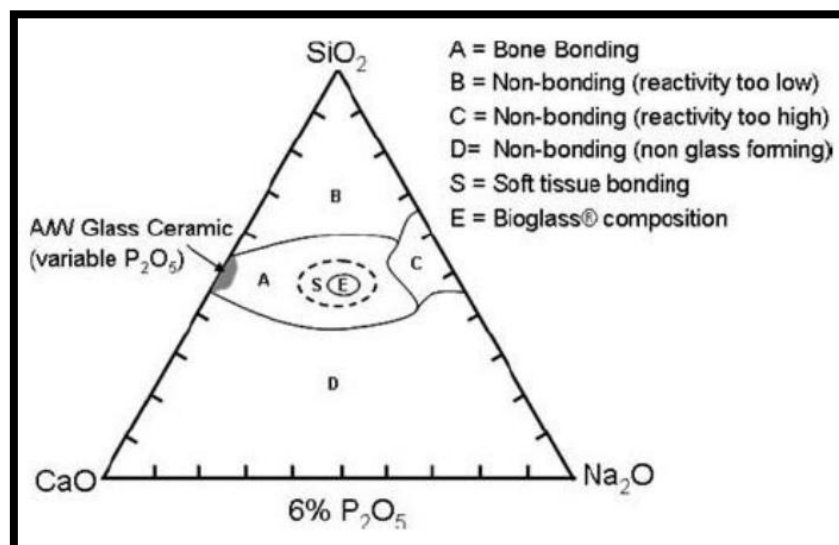


Figura 6. Diagramma composizionale per la formazione del legame del vetro con l'osso e tessuti molli [Kokubo, 2008]

Il **Bioglass®** si trova esattamente all'interno della regione S. Per tenori di SiO_2 superiori al 60% si perde la possibilità del materiale di formare legame con i tessuti e pertanto, il materiale risultante sarà bioinerte.

Oltre alla bioattività l'altra peculiarità dei biovetri, ed in particolare del **Bioglass®**, è l'osteoconduzione data dal rilascio di ioni Si, Ca, P nei fluidi biologici o di simulazione con formazione di uno strato di idrossiapatite carbonata per fenomeno di chemiadsorbimento. Questo ed altri aspetti sono stati schematicamente illustrati in **Figura 7**.

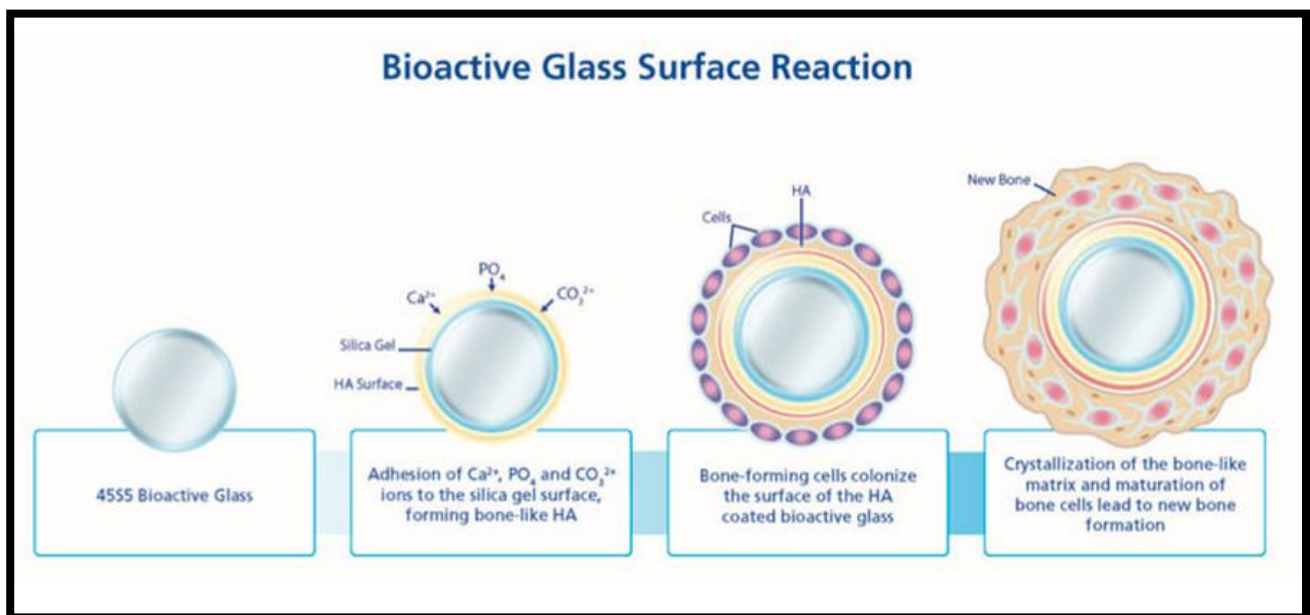


Figura 7. Schematizzazione dei fenomeni reattivi aventi luogo sulla superficie del biovetro **Bioglass®**[

<http://ryortho.com/2014/10/bioglass-is-back-in-an-incredible-new-form/>]

Quando il biovetro viene inserito nei tessuti viventi, il pH dell'ambiente locale aumenta e tende al valore di circa 10. Sulla superficie del materiale si forma uno strato ricco di gel di silice, mentre nella parte superiore del gel si deposita uno strato di **HCA**, ricco di calcio e fosfati i cui costituenti che provengono sia dal biovetro che dall'organismo. Lo strato di **HCA** funziona da superficie attiva di legame, chimicamente e strutturalmente equivalente alla sostanza minerale dell'osso naturale.

Una rappresentazione sequenziale dei fenomeni principali aventi luogo sulla superficie del biovetro è riportata in **Figura 8**.

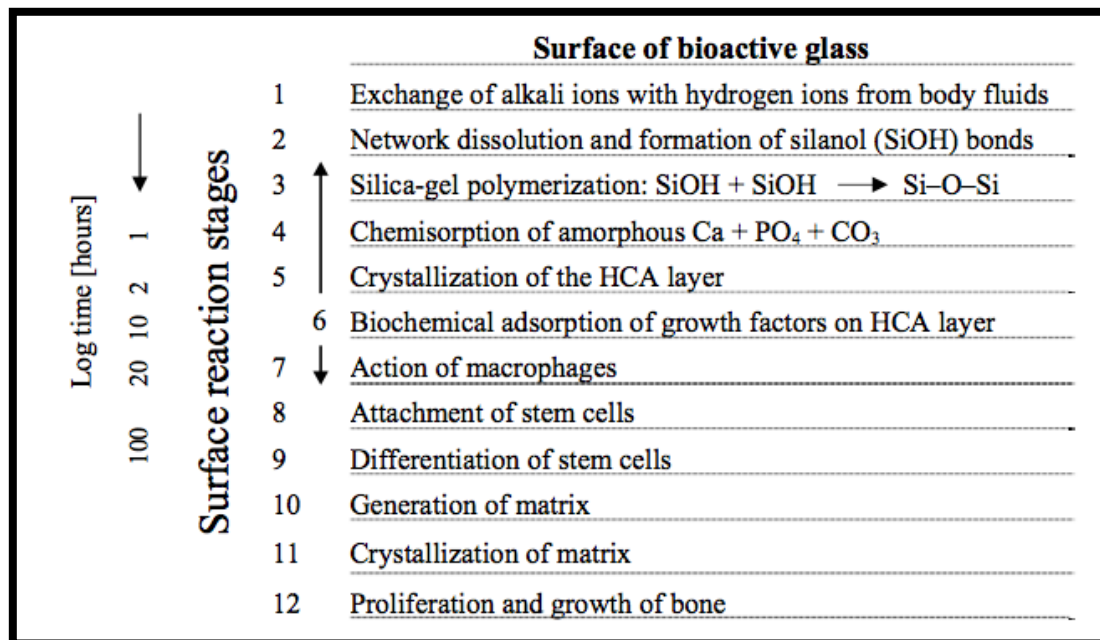


Figura 8. Sequenza di fenomeni all'interfaccia coinvolti nella formazione di un legame tra osso e vetro bioattivo [Gerhardt e Boccaccini, 2010]

Lo strato di **HCA** rappresenta dunque la prima interfaccia utile all'attacco e la deposizione di fattori di crescita, favorendo così la successiva adesione cellulare. Il biovetro, nella sua forma porosa o in polvere, non solo è un materiale bioattivo ma anche biodegradabile. Infatti esso è in grado di indurre delle reazioni che portano i tessuti ossei ad autoripararsi, sotto opportuni stimoli, evitando il ricorso alla chirurgia sostitutiva, limitando gli interventi invasivi e l'innesto di protesi permanenti.

Per quanto riguarda la formazione del legame con l'osso, il biovetro ha il pregio indiscusso di rivestirsi, una volta innestato nell'organismo, di uno strato di apatite idrossi-carbonata (**HCA**), la

cui presenza facilita la formazione di legami con il tessuto osseo in virtù della sua strettissima somiglianza compositiva con la componente inorganica dell'osso naturale. Il legame con i tessuti molli, invece, avviene grazie al chemioadsorbimento di fibrille di collagene sullo strato superficiale. Sono stati portati avanti degli studi in letteratura che hanno permesso di evidenziare il progressivo degradamento sino alla completa scomparsa del rivestimento più superficiale costituito da Biovetro e la contemporanea formazione di uno spesso strato di tessuto osseo. Un esempio a riguardo è stato riportato in **Figura 9**, in cui è mostrata una sezione trasversale di una protesi d'anca con stelo metallico rivestito con biovetro.

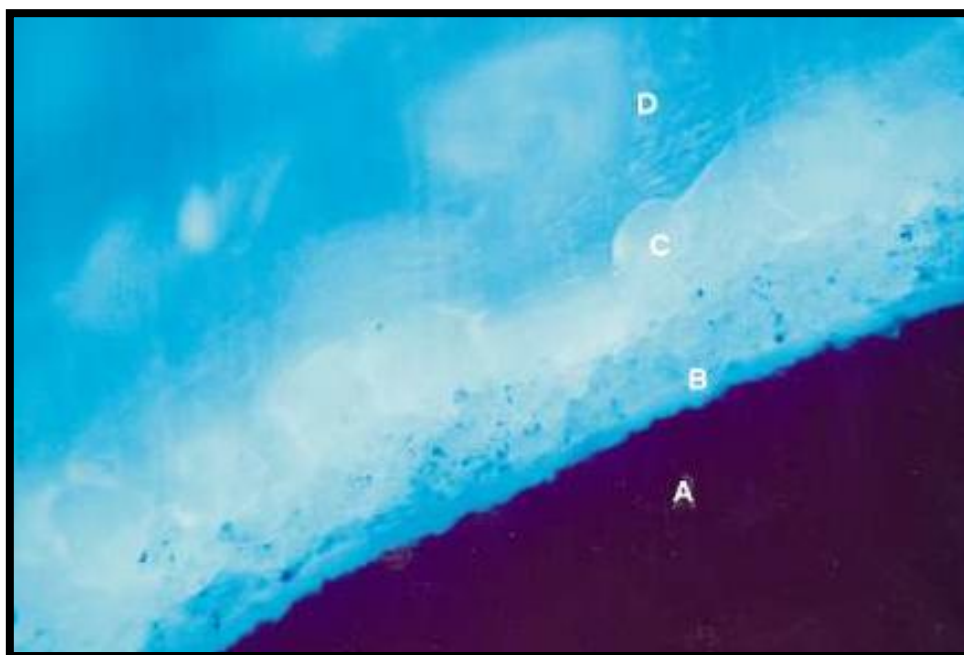


Figura 9. Osservazione al Microscopio ottico a luce U.V. (Ingrandimento 10X) di una regione di una protesi d'anca rivestita da biovetro. L'immagine evidenzia la presenza dei due strati di rivestimento del provino. A= Metallo; B Idrossilapatite; C= Biovetro; D= Cavità midollare [<http://www.unipr.it/arpa/facvet/annali/2000/gabbi/fig1.jpg>]

La preparazione di questi materiali può avvenire dal fuso o mediante tecnica sol-gel. Il loro principale limite applicativo è la fragilità; per tale motivo sono in fase di studio delle nuove tecnologie di produzione dei pezzi massivi che conferiscano delle proprietà meccaniche superiori. La lavorazione del materiale deve poter conferire buone proprietà senza influire negativamente sulla bioattività del biovetro. A questo proposito è importante sottolineare che il raggiungimento di eventuali livelli critici di temperatura e pressione, necessari per ottenere il materiale in forma densa, possono portare alla modifica della natura amorfa e della composizione del biovetro.

La necessità di mantenere la struttura vetrosa nel bioceramico è legata al fatto che è riconosciuto in letteratura, come si mostrerà nel seguito, che la cristallizzazione produce tipicamente un peggioramento delle sue caratteristiche di bioattività. Poiché però il processo di utilizzazione delle polveri di biovetro comporta il raggiungimento di temperature relativamente elevate, è possibile aspettarsi che i fenomeni di cristallizzazione possano aver luogo. A titolo di esempio, in **Figura 10** sono riportate le trasformazioni, strutturali e compositive, principali che hanno luogo relativamente al Bioglass **45S5** al variare della temperatura [Lefebvre et al. 2008]. Da tale figura risulta chiaro che i fenomeni di cristallizzazione iniziano ad avere luogo attorno a 610°C con la formazione della fase cristallina $\text{Na}_2\text{CaSi}_2\text{O}_6$.

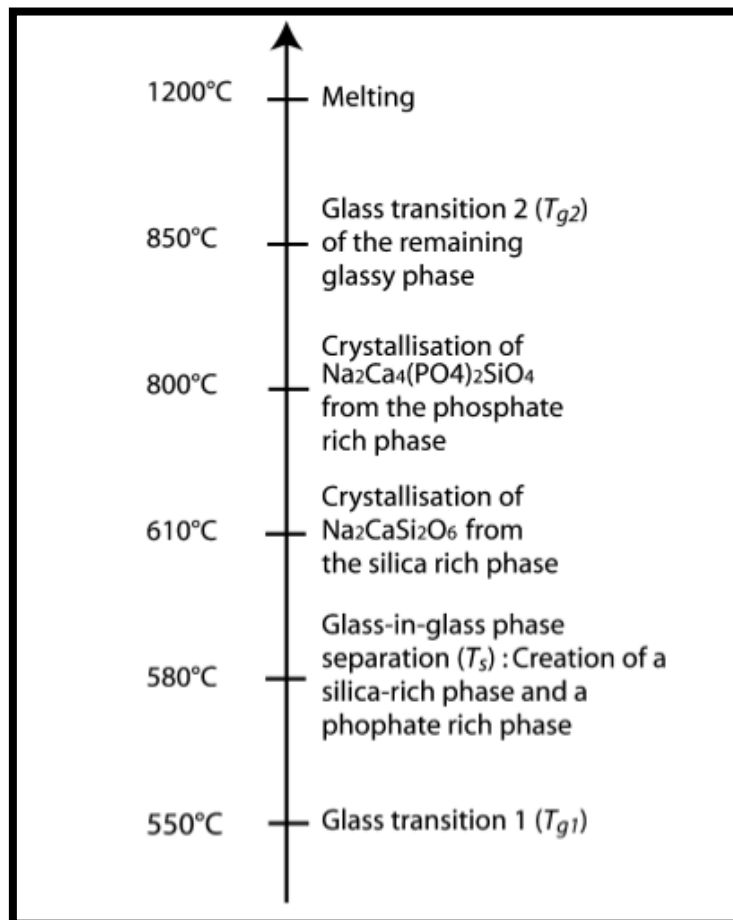


Figura 10. Trasformazioni strutturali avanti luogo nel **Bioglass 45S5** al variare della temperatura [Lefebvre et al, 2008]

Al fine di ottenere campioni di biovetro evitando la cristallizzazione è necessario dunque operare in condizioni di temperatura, carico e tempo di sinterizzazione che limitino l'insorgere di fenomeni di cristallizzazione [Grasso et al, 2012]. A tal riguardo è opportuno osservare quanto segue.

È stato precedentemente menzionato il fatto che la bioattività del biovetro è attribuita alla formazione di uno strato superficiale di apatite idrossilcarbonata, simile alla parte minerale dell'osso. Il legame tra il biovetro e la matrice ossea sembra dipendere dalla cinetica di formazione

dell' **HCA**, che segue una sequenza di reazioni tra il materiale impiantato e i circostanti tessuti e fluidi fisiologici. In particolare, è importante mettere in risalto il fatto che esiste un forte legame tra la percentuale di fase cristallina nel campione e la velocità di formazione dello strato di **HCA**. Questo aspetto è evidente in **Figura 11** dove è stato riportato il tempo necessario per la formazione dello strato di **HCA** in funzione del grado di cristallinità sul Bioglass **45S5** [Filho et al. 1995]. Dalla **Figura 11** si evince chiaramente come, al fine di favorire la formazione dello strato di **HCA** occorra limitare il fenomeno della cristallizzazione durante il processo di sinterizzazione.

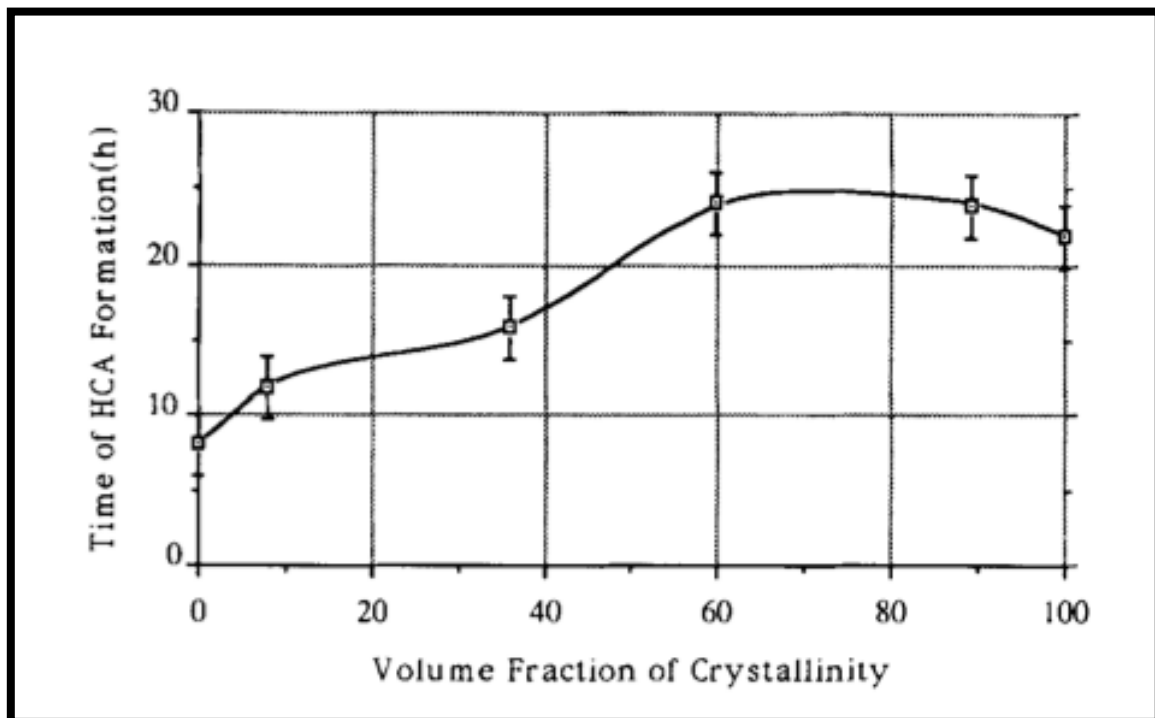


Figura 11. Tempo richiesto per la formazione dello strato di **HCA** in soluzione fisiologica in funzione del grado di cristallizzazione del **Bioglass 45S5** [Filho et al, 1995]

È stato dimostrato che l'aggiunta di CaO nei vetri conferisce ad essi la caratteristica di bioattività. Oltre a questo, risulta particolarmente importante conoscere se la variazione della composizione del biovetro, con specifico riferimento al contenuto di CaO, comporti o meno delle variazioni sulla temperatura di cristallizzazione. In **Tabella 1** è possibile osservare che all'aumentare del rapporto CaO/Na₂O l'inizio del processo di cristallizzazione viene spostato a temperature maggiori.

Indice Biovetro	Na₂O (wt%)	CaO (wt%)	SiO₂ (wt%)	P₂O₅ (wt%)	Temperatura di inizio cristallizzazione (°C)
BG1	47.0	-	47.0	6.0	600±5
BG2	37.6	9.4	47.0	6.0	600±4
BG3	32.9	14.1	47.0	6.0	635±6
BG4	28.2	18.8	47.0	6.0	700±8
BG5	23.5	23.5	47.0	6.0	700±8
BG6	18.8	28.2	47.0	6.0	700±10
BG7	14.1	32.9	47.0	6.0	680±8
BG8	9.4	37.6	47.0	6.0	800±5
BG9	4.7	42.3	47.0	6.0	825±10

Tabella 1 . Influenza della composizione del biovetro sulla temperature di inizio cristallizzazione [Lokyer et al., 1995]

Nasce da queste considerazioni l'idea di studiare un nuovo tipo di biovetro che permetta di operare con temperature di sinterizzazione più elevate, limitando il fenomeno di cristallizzazione, pur mantenendo la possibilità di ottenere un campione denso e con invariate caratteristiche di bioreattività.

1.2 LA SINTERIZZAZIONE

La sinterizzazione è un fenomeno che porta alla formazione di legami tra particelle di un solido in forma di polvere in una struttura solida coerente, attraverso scambi di materia che avvengono su scala atomica a seguito di opportuni trattamenti termici. Per “sinterizzazione” si intende il processo di densificazione il quale comprende la rimozione della porosità tra le particelle di partenza, la coalescenza e la formazione di legami forti fra particelle adiacenti. Questo processo rappresenta il nucleo centrale che sta alla base della produzione di ceramici sia avanzati che tradizionali. Ragionando in termini strettamente tecnici, la sinterizzazione è un “processo mediante il quale piccole particelle di un materiale vengono generalmente consolidate attraverso fenomeni di diffusione allo stato solido”. Pertanto, quando si parla di densificazione, si intende dire che la sinterizzazione porta alla trasformazione di un prodotto poroso compatto in uno più denso e coerente. La sinterizzazione ha la capacità di ridurre quel 26% di volume vuoto che si ha compattando un sistema di particelle microscopiche viste idealmente come sferiche.

Questo processo può compiersi grazie a diversi meccanismi:

- Sinterizzazione per via viscosa, detta anche vetrificazione;
- Sinterizzazione con fase liquida;
- Sinterizzazione allo stato solido;

di seguito verranno riassunti in modo descrittivo i principi dei fenomeni che guidano la sinterizzazione.

1.2.1 Sinterizzazione viscosa

Quando la sinterizzazione avviene con questo meccanismo, il sistema avente una certa composizione ad una determinata temperatura presenta una percentuale di fase liquida che è diversa dai restanti reagenti. Questa fase è in grado di eliminare i gas presenti tra le particelle. In particolare, è sufficiente che si abbia la conversione in fase liquida di meno di un quarto della totalità del sistema per avere l'eliminazione totale delle porosità. Questo avviene per l'azione delle forze di scorrimento viscoso e di capillarità che diffondono rafforzando la massa.

In seguito, quando il trattamento termico è terminato e si procede al raffreddamento interverrà il fenomeno di vetrificazione, durante il quale la massa liquida solidifica legando le particelle che non hanno fuso. In **Figura 12** è mostrato schematicamente il fenomeno di formazione della fase liquida e la riduzione del volume occupato dal sistema.

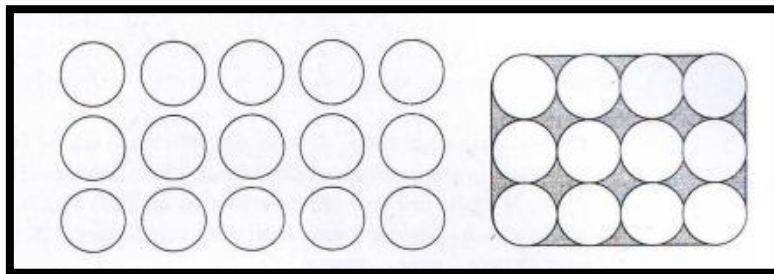


Figura 12. Riduzione del volume occupato dal sistema e legame delle particelle per vetrificazione della fase fusa

Questo processo è quello che viene impiegato per la produzione di ceramici tradizionali come ceramica e gres, può essere interpretato con il modello di Frenkel. Quest'ultimo è basato su due sfere a contatto, costituite da materiale viscoso e dotato di una tensione superficiale costante durante tutto il fenomeno isoterma. Sulla base di questo modello, la variazione relativa di volume, è

funzione della durata del trattamento termico e dipende dalla tensione superficiale γ , dalla viscosità η e dal raggio delle sfere r secondo la seguente formula.

$$\frac{\Delta V}{V_0} = \frac{9\eta}{4\gamma} \cdot \frac{t}{r_0}$$

1.2.2 Sinterizzazione con fase liquida

Come per quanto avviene nella sinterizzazione per via viscosa, anche in quella con fase liquida una parte del sistema cambia stato, ma in questo caso la quantità della fase fusa risulta non adeguata per l'eliminazione della fase gassosa. Questa tecnica è usata per sistemi dove la sinterizzazione allo stato solido è sconsigliata in termini tecnologici a causa delle eccessivamente alte temperature o tempi troppo lunghi. Perché il fenomeno sia efficace, la fase liquida deve formarsi a temperature relativamente basse in modo da permettere il deflusso del gas e il rimodellamento dei grani.

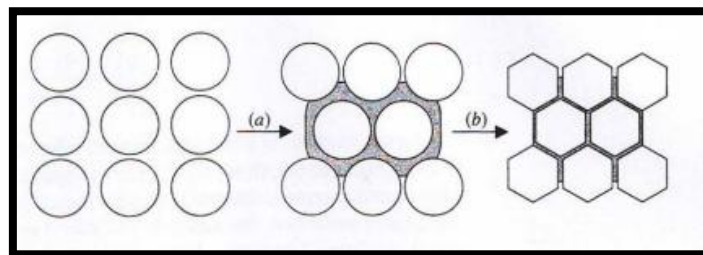


Figura 13. Schematizzazione della sinterizzazione con fase liquida (a) aggregazione particelle, (b) dissoluzione e riprecipitazione

Questa tecnica è attualmente utilizzata per la produzione ceramica moderna. In questo ambito la problematica principale è rappresentata proprio dalla formazione della fase liquida per l'attivazione del processo.

1.2.3 Sinterizzazione allo stato solido

La sinterizzazione allo stato solido quando le particelle di una sostanza vengono compattate e trattate termicamente ad una temperatura alla quale non si verificano fenomeni di fusione. Pertanto la formazione del legame ha luogo senza intercessione della fase liquida. La compattazione avviene tramite diffusione allo stato solido degli atomi attraverso il reticolo cristallino e i bordi di grano. Durante il processo si hanno anche dei fenomeni di crescita dei grani. In definitiva, durante il processo condotto a temperature molto elevate, ma pur sempre inferiori al punto di fusione del composto che si vuole sinterizzare, le particelle di polvere ceramica tendono ad agglomerarsi per effetto diffusivo allo stato solido. In **Figura 14** è riportata una rappresentazione di questa progressiva agglomerazione delle particelle.

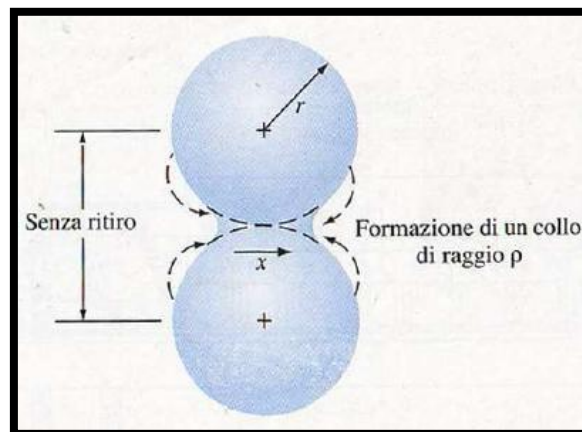


Figura 14. Rappresentazione della formazione del collo tra due particelle in progressiva agglomerazione [J.H Brophy et al]

I legami che si formano durante la sinterizzazione si evidenziano come una crescita coesa di strutture denominate colli (“neck”) nei punti di contatto tra le particelle, come è possibile osservare anche dalla **Figura 15**.

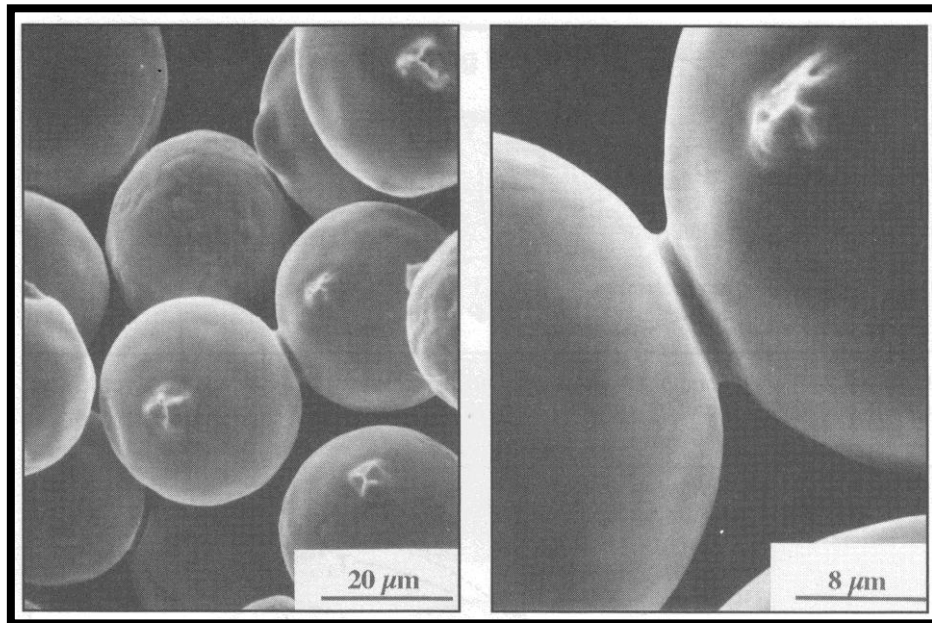


Figura 15. Scansione a microscopio elettronico di un gruppo di particelle durante la sinterizzazione [German, 1994]

Come sopraccitato, la formazione di questi legami comporta una maggiore resistenza della struttura coesa risultante e una minore energia di sistema.

A monte del processo di sinterizzazione le polveri non occupano efficientemente lo spazio che hanno a disposizione. Tipicamente, esse vengono sottoposte all'applicazione di una pressione dando luogo alla formazione di un compatto, con l'obiettivo di aumentare la densità delle polveri e dare loro una forma definita.

Queste forme vengono quindi sinterizzate. La densità V_s dei compatti e dei sinterizzati è generalmente espressa in termini relativi come un rapporto tra la densità del sistema (ρ) e quella teorica (ρ_t) del solido (corrispondente a quella che avrebbero le polveri in assenza di porosità):

$$V_s = \frac{\rho}{\rho_t}$$

Il valore di V_s viene spesso espresso in termini percentuali.

La densità è probabilmente il parametro più importante nello studio sulla sinterizzazione. Essa è legata alla cinetica del processo, che a sua volta dipende da diverse proprietà dei materiali sinterizzati [German, 1996].

La sinterizzazione è caratterizzata dalla diminuzione dell'area superficiale S del sistema rispetto al valore iniziale S_0 . Nello specifico, la perdita di questa area, misurata dal rapporto $\Delta S/S_0$, (dove $\Delta S = S_0 - S$) è una grandezza che può essere indicativa del grado di sinterizzazione. Così come $\Delta S/S_0$, anche la diminuzione delle dimensioni lineari $\Delta L/L_0$ (rapporto tra lunghezza caratteristica del sistema prima e dopo il trattamento) permette di ottenere delle informazioni importanti sullo stato di avanzamento della densificazione. Come detto in precedenza, il processo di sinterizzazione si evidenzia con la formazione e la crescita di colli di coesione tra le particelle a contatto. L'estensione di questi colli di coesione è quindi rappresentativo del grado di sinterizzazione. In particolare, con riferimento allo schema riportato in **Figura 16**, è spesso impiegato il rapporto relativo del collo definito come suo diametro diviso per quello della particella. Se questo rapporto cresce durante il

processo di sinterizzazione, significa che aumenta la dimensione dei colli, il compatto densifica e aumenta la sua robustezza. Misure come la densità e la contrazione sono facili da effettuare e forniscono un'indicazione della velocità dei cambiamenti aventi luogo durante la sinterizzazione.

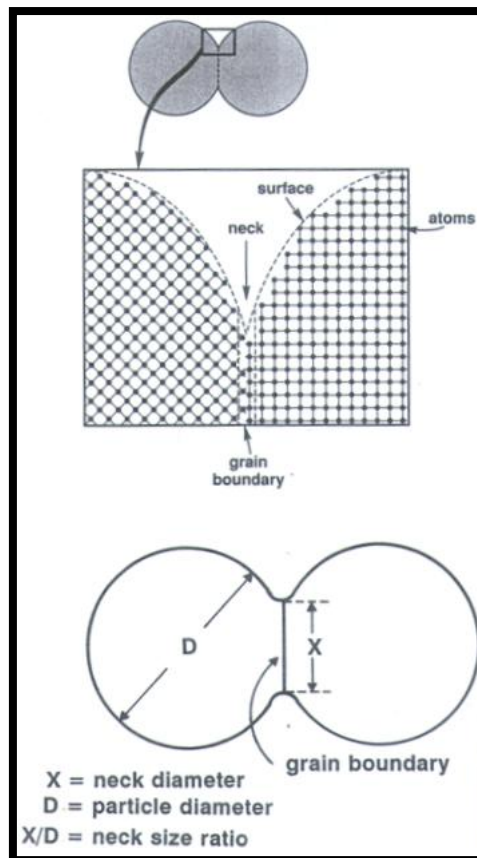


Figura 16. Rapporto tra il diametro del collo e quello della particella [German, 1996]

Come illustrato in **Figura 17** la sinterizzazione delle particelle avviene in vari stadi. Inizialmente esse sono poste a contatto e di seguito, durante il riscaldamento ha luogo la formazione dei colli che crescono di dimensione con una contemporanea ed estensiva perdita di area superficiale. Successivamente (stadio intermedio), la geometria dei pori diventa progressivamente arrotondata e

le particelle singole meno evidenti. Quest'ultimo dà luogo a una struttura di pori tubulare e rotonda che è aperta sulla superficie del compatto. Alcuni sistemi vengono sinterizzati solo fino a questo punto, laddove si desidera preservare la porosità. In caso contrario, si procede allo stadio finale della sinterizzazione che è caratterizzato dalla contrazione dei pori residui. Quelli rimanenti a seguito della contrazione assumono una forma sferica e perdono contatto con la superficie del campione.

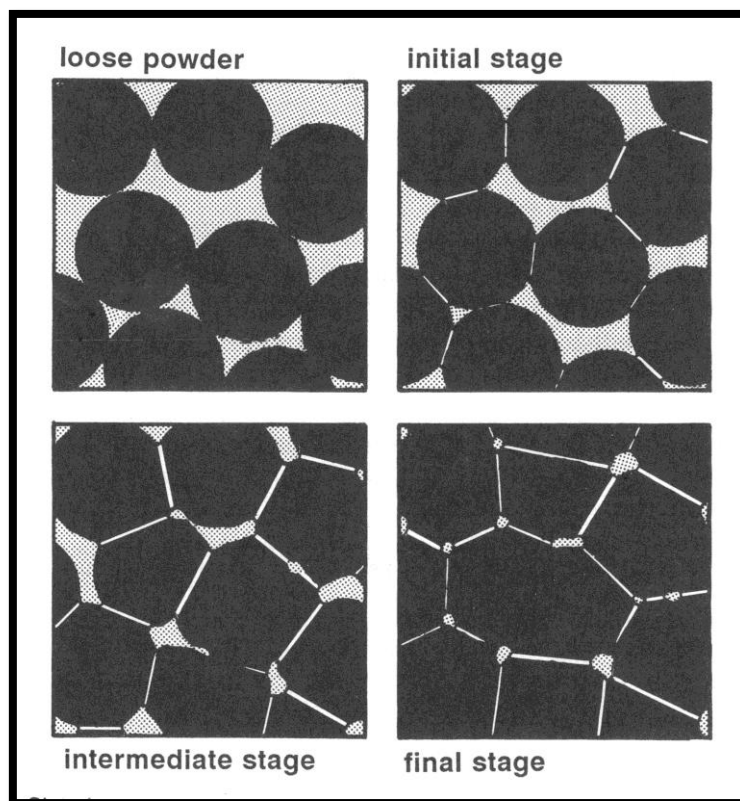


Figura 17. Gli stadi coinvolti durante l'evoluzione del fenomeno della sinterizzazione [German, 1996]

1.3 Tecniche di Sinterizzazione

Sinterizzazione Termica (a pressione ambiente)

Questo tipo di sinterizzazione a pressione ambiente prevede dapprima la pressatura delle polveri in uno stampo. Il materiale solido prende così la forma dello stampo tramite un binder, solitamente di origine organica. Successivamente avviene il trattamento termico in forno che permette di eliminare il binder e portare le polveri a densificazione. Le temperature ed i tempi di processo sono determinati dal tipo di materiale e dalle dimensioni dei pezzi da ottenere.

Sinterizzazione Termomeccanica

In questo caso l'aumento della temperatura agisce in contemporanea all'applicazione di una pressione meccanica sul materiale. La tecnologia più nota ed utilizzata di compattazione a caldo è la cosiddetta "Hot pressing" o HP. Come illustrato in **Figura 18** le polveri, disposte all'interno di un porta campione tipicamente in grafite, vengono riscaldate attraverso l'impiego di elementi esterni.

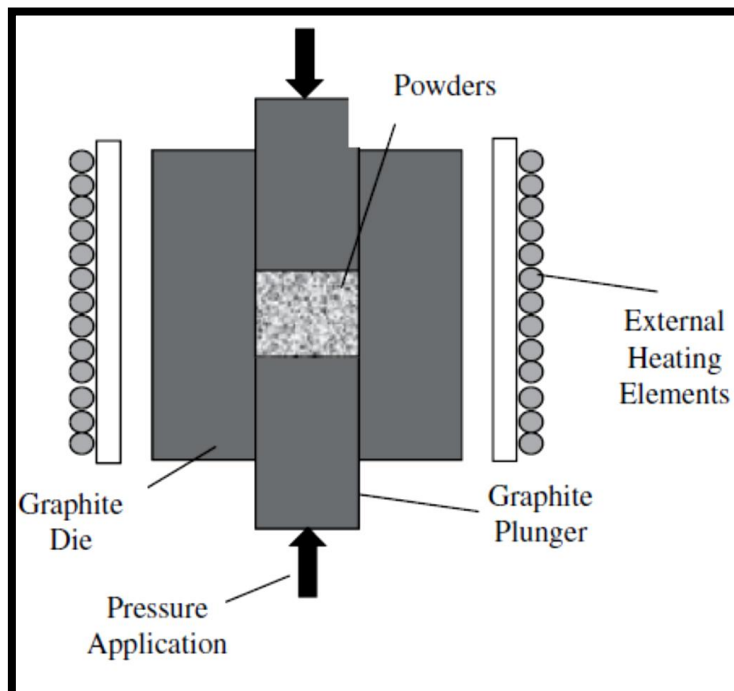


Figura 18. Rappresentazione schematica della tecnica HP

Simultaneamente le polveri vengono pressate mediante l'applicazione di un carico meccanico applicato assialmente. L'azione congiunta del riscaldamento delle polveri e della pressione consente di accelerare il processo di consolidamento del campione.

Un altro esempio in cui viene impiegata la sinterizzazione termo meccanica è rappresentata dalla cosiddetta tecnica HIP. "Hot Isostatic Pressing", il cui principio è stato schematizzato in **Figura 19**.

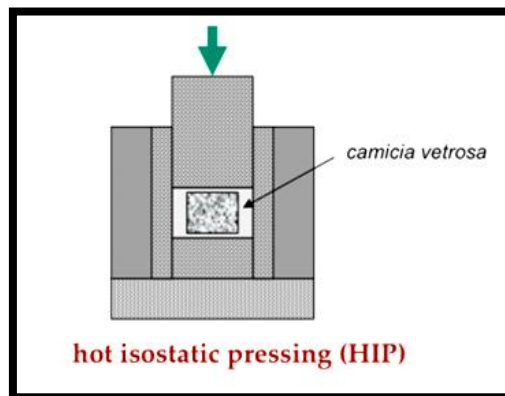


Figura 19. Schematizzazione tecnica HIP (Hot Isostatic Pressing)

Questa viene eseguita in stampi appositi che permettono di comprimere in modo isostatico le polveri, questo avviene attraverso un liquido o un gas. Si possono avere delle pressioni di esercizio fino ai 50 MPa e temperature fino ai 2100°C.

Tecniche di sinterizzazione innovative

Al fine di rendere più efficienti i processi di consolidamento delle polveri rispetto a quelli convenzionalmente impiegati e che sono stati menzionati precedentemente, di recente sono stati sviluppati alcune tecnologie innovative di sinterizzazione.

Fra queste risultano particolarmente interessanti quelle nelle quali, le polveri da sinterizzare vengono riscaldate in modo più o meno diretto, per esempio tramite correnti elettriche o campi elettromagnetici. Negli ultimi anni sono oggetto di studio grazie al minor consumo energetico. Alcuni esempi sono rappresentati dalla “Selective Laser Sintering” o **SLS** mostrato in **Figura 20**, e

soprattutto dalla tecnologia **SPS** “Spark Plasma Sintering” che viene impiegata nell’ambito di questo lavoro e verrà illustrata nel dettaglio nel prossimo paragrafo.

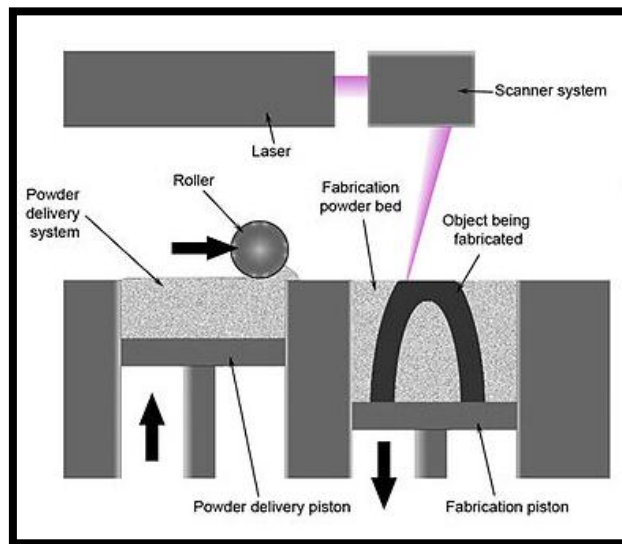


Figure 20. Rappresentazione schematica della tecnologia SLS [http://en.wikipedia.org/wiki/Selective_laser_sintering]

1.3.2 Tecnologia di sinterizzazione SPS

Come accennato precedentemente, nel presente lavoro di tesi la densificazione delle polveri di idrossiapatite e di biovetro è stata realizzata impiegando la tecnica di sinterizzazione SPS. Il principio di funzionamento di questa tecnologia di sinterizzazione può essere spiegato facendo riferimento alla schematizzazione della stessa riportata in **Figura 21**. Le polveri di partenza vengono disposte all’interno di uno stampo in grafite, il quale viene poi inserito in un circuito elettrico. La chiusura di quest’ultimo porta al passaggio di una corrente elettrica pulsata attraverso le polveri stesse, se conduttive, o attraverso il portacampioni in grafite con conseguente sviluppo di

calore per “effetto Joule”. Il calore generato provoca un rapido riscaldamento delle polveri, fornendo così l’energia necessaria per attivare il processo di sinterizzazione desiderato. La simultanea applicazione della pressione meccanica, agente in direzione assiale, rende possibile l’ottenimento del prodotto finale con elevato grado di densificazione. La maggior parte degli studi riportati in letteratura hanno mostrato come tale tecnologia consenta di ottenere generalmente compatti di densità desiderata sotto condizioni di temperatura ridotte e in tempi significativamente più brevi rispetto all’utilizzo di tecniche tradizionali di sinterizzazione quali, ad esempio, la pressatura tradizionale a caldo HP (*Hot Pressing*) e la pressatura isostatica a caldo HIP (*Hot Isostatic Pressing*) [Orrù et al., 2009]. L’interpretazione in genere fornita per spiegare il principio su cui si basa la tecnica in oggetto poggia su concetti fondamentalmente legati alla rapida produzione di calore mediante effetto Joule, e quindi ad un effetto di temperatura. Tuttavia, non è escluso che l’applicazione della corrente elettrica durante l’evoluzione di reazioni in fase condensata possa giocare anche altri ruoli, peraltro non del tutto chiariti [Orrù et al., 2009]. Per esempio, fenomeni di elettromigrazione sembrerebbero incrementare la velocità dei fenomeni diffusivi che intervengono sulle reazioni di formazione dei prodotti [Garay et al., 2003] e sui processi di densificazione, con conseguente riduzione dei tempi di sintesi per l’ottenimento di manufatti densi.

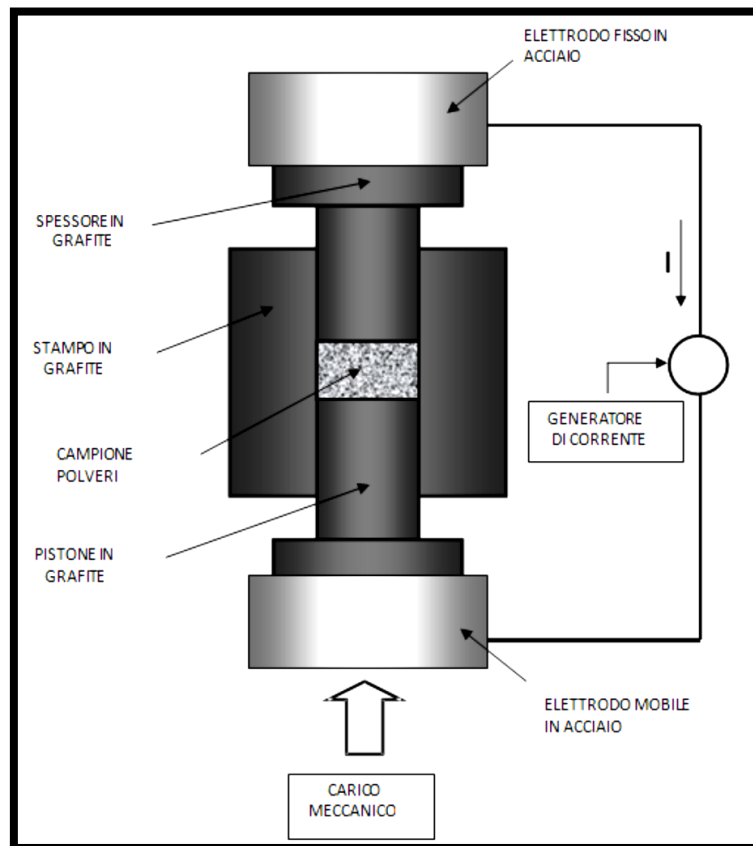


Figura 21. Schema del principio di funzionamento dell'apparecchiatura SPS

Inoltre, alcuni autori hanno ipotizzato la formazione di un plasma ad alta energia all'interno del compatto di polveri, per effetto dell'elevata frequenza di pulsazione della corrente applicata durante il processo e della piccola superficie di contatto tra le parti calde del compatto iniziale. Questo fenomeno sembrerebbe contribuire, tra gli altri effetti, alla veloce rimozione degli ossidi superficiali che limitano generalmente la sinterizzazione delle polveri, consentendo di realizzare il consolidamento a temperature più basse rispetto alle tecniche convenzionali [Cha et al., 2003]. Per quanto la generazione del plasma non sia stata a tutt'oggi identificata in modo diretto [Omori, 2000], da questo aspetto deriva la denominazione commerciale di *Spark Plasma Sintering*.

Capitolo 2

Sinterizzazione di polveri di idrossiapatite

Nel presente capitolo verranno descritti gli aspetti sperimentali le modalità di lavoro ed i principali risultati riguardanti la sinterizzazione di tre diverse tipologie di idrossiapatite con vari gradi di purezza, differenti dimensioni dei grani e stabilità termica, allo scopo di mettere in evidenza il ruolo svolto da tali peculiarità nel processo di sinterizzazione e ottenimento dei densi, nonché nelle caratteristiche meccaniche di questi.

2.1 INTRODUZIONE

Come indicato nei capitoli precedenti, l'idrossiapatite corrisponde alla formula $(\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2)$ ed è spesso indicata come **HAp** o **HA**. Questo composto rappresenta il componente inorganico maggioritario del tessuto osseo umano e pertanto non è difficile pensare alle potenzialità ed al motivo per il quale questo materiale venga studiato dal punto di vista applicativo nelle sue forme massive e come rivestimento [**Dorozhkin, 2010; Bolelli et al., 2014**].

Proprio per questa ragione sono stati fatti diversi studi aventi come scopo l'ottenimento dell'**HAp** in forma massiva a partire da polveri ed impiegando tecniche di compattazione. [Champion, 2013].

A tal riguardo, uno degli aspetti fondamentali è la stabilità termochimica dei materiali di partenza.

A tal proposito è importante sottolineare che il raggiungimento di eventuali livelli critici di temperatura e pressione, necessari per ottenere il materiale in forma densa, possono portare alla modifica della struttura cristallina e della composizione dell'**HAp**.

In particolare possono avere luogo trasformazioni di fase, decomposizione delle polveri e deidrossilazione, che comportano un peggioramento delle proprietà del prodotto.

La deidrossilazione avviene prima della decomposizione, che richiede il raggiungimento di temperature più elevate. La deidrossilazione porta alla formazione dell'ossi-idrossiapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)\text{O}_x(\text{OH})_{2(1-x)}$, OHAp) e ossiapatite ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{O}$, OAp), mentre i prodotti della seconda sono fosfato tricalcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, TCP) e fosfato tetracalcico ($\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$, TTCP) secondo la seguente equazione:



Questi composti mostrano solubilità superiore rispetto all'**HAp** in ambiente acquoso, ciò migliora la degradazione in vivo dei prodotti dell'**HAp**, ma deteriora la sua stabilità chimica e le relative proprietà meccaniche.

Pertanto, al fine di ottenere **HAp** densa evitando la decomposizione è necessario operare in condizioni ottimali di temperatura, carico e tempo di sinterizzazione [Liu e Shen, 2012].

Da questo punto di vista, la tecnica SPS offre un metodo promettente che permette di ottenere dei prodotti densi, utilizzando delle condizioni di processo più blande rispetto alle tecnologie di compattazione a caldo convenzionalmente utilizzate [Orrù et al., 2009]. Infatti la corrente pulsata che attraversa il portacampione in grafite contenente le polveri consente un riscaldamento diretto delle stesse, a differenza di quanto avviene nella tecnologia **HP** dove si utilizzano degli elementi riscaldanti esterni. In base a quanto appena detto, sono stati recentemente svolti diversi studi che sfruttano i vantaggi della tecnica SPS per l'ottenimento di prodotti ceramici a base di **HAp** [Gu et al., 2002; Kim et al., 2013].

Molti di questi lavori sono basati sull'ottenimento di densi a partire da polveri sintetizzate in laboratorio [Gu et al., 2002; Kumar et al., 2003; Lee et al., 2006; Guo et al., 2007; Xu et al., 2007; Eriksson et al., 2011; Kim et al., 2013] o da polveri commerciali [Nakahira et al., 2002, Guo et al., 2005, Gandhi et al., 2010, Liu et al., 2012, Kim et al., 2013]. Sono stati studiati anche dei metodi di sinterizzazione reattiva via SPS a partire da $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e $\text{Ca}(\text{OH})_2$ come promotori della reazione di sintesi. [Omori et al., 2006]. A causa delle diverse caratteristiche delle polveri di partenza, le condizioni individuate per l'ottenimento dei prodotti densi ricadono in un intervallo piuttosto ampio, tra i 700 e i 1200°C. In ogni caso il beneficio derivante dall'utilizzo della tecnica SPS è confermato dalle caratteristiche possedute dai campioni ottenuti nelle condizioni ottimali. La formazione del TCP che si osserva a causa dell'avanzamento della decomposizione non è legata esclusivamente all'utilizzo di condizioni più drastiche nella sinterizzazione [Kumar et al., 2003, Lee et al., 2006, Xu et al., 2007]. Per esempio non si trova nessuna fase aggiuntiva oltre **HAp** nei campioni con densità pari a 99.7%, che sono stati sinterizzati a 1200°C con un tempo di 10 minuti

[Watanabe et al., 2005]. Viceversa la presenza del β -TCP è riscontrata da [Lee et al., 2006] in campioni con densità di 96.4% ottenuti alla temperatura di 1000°C.

Si può affermare che l'impiego di un diverso macchinario SPS, la diversa configurazione dello stampo adottati e soprattutto le caratteristiche delle polveri iniziali giocano un ruolo rilevante nel determinare la decomposizione di **HAp**.

Risulta quindi importante avviare degli studi che intendono approfondire questi aspetti. In tale ambito, nel presente lavoro si è proceduto alla sinterizzazione di tre tipologie di polveri commerciali con lo scopo di ottenere informazioni, sul legame, tra le caratteristiche compositive e strutturali delle polveri di partenza e le proprietà dei prodotti di sinterizzazione. Inizialmente le polveri sono state caratterizzate tramite analisi granulometrica, diffrazione dei raggi X, microscopia elettronica a scansione, trattamenti termici in forno e termogravimetria. Le medesime polveri sono state sottoposte a sinterizzazione tramite SPS. L'obiettivo primario è quello di determinare le temperature ottimali del processo di sinterizzazione, mantenendo invariati gli altri parametri quali: carico meccanico, velocità di riscaldamento, tempo di permanenza e configurazione del portacampione. I campioni ottimali così ottenuti sono stati analizzati dal punto di vista composizionale e microstrutturale.

2.2 PARTE SPERIMENTALE

Le caratteristiche generali delle polveri utilizzate sulla base dei dati trasmessi dal fornitore, sono riportate in **Tabella 2**. Sono state eseguite delle analisi granulometriche per la determinazione delle dimensioni delle particelle di polvere, impiegando lo strumento a diffusione di luce laser (CILAS 1180, France) illustrato in **Figura 22**.



Figura 22. Granulometro CILAS 1180

Di seguito vengono riportate le caratteristiche principali delle polveri di partenza fornite dalle ditte produttrici.

System ID	Supplier/Code	Particle size (μm)	Compositional details
HAp_1	Sigma-Aldrich Cod. 21223	25-45 (average)	$\geq 90\%$ purity (KT as $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$)
HAp_2	Alfa-Aesar Cod. 36731	< 44	Calcium phosphate tribasic, 38.1% Ca
HAp_3	Plasma Biotol Ltd Cod. CAPITAL 60-1	$d_{10} = 21.7$ $d_{50} = 43$ $d_{90} = 77.8$	Hydroxyapatite, Whitlockite ($< 1\%$)

Tabella 2 Caratteristiche delle polveri iniziali di idrossiapatite

Oltre alla misura granulometrica le polveri sono state sottoposte ad analisi tramite diffrazione dei raggi X impiegando lo strumento Philips PW1830 rappresentato in **Figura 23** fornito di tubo in rame con $K\alpha$ avente lunghezza d'onda di ($\lambda=1.5405 \text{ \AA}$).



Figura 23. Diffrattometro a raggi X utilizzato nel nostro studio

La morfologia delle polveri è stata osservata tramite microscopia elettronica a scansione il cui strumento è riportato in **Figura 24** (SEM, mod. S4000, Hitachi, Giappone).



Figura 24. Microscopio a scansione elettronica utilizzato nelle caratterizzazioni

Le polveri iniziali sono state dapprima sottoposte a trattamenti termici in forno (Nabertherm, mod. N60/ER, Germania), in un range di temperature tra 700 e 1250°C e in atmosfera ambiente al fine di ottenere delle informazioni sulla stabilità termica delle stesse. Oltre a questi trattamenti termici si è proceduto all'analisi termogravimetrica con opportuna rampa di riscaldamento (10°C/min), da temperatura ambiente fino a 1450°C (NETZSCH STA 409PC Simultaneous DTA-TGA) in presenza di un flusso d'aria di 100mL/min. Un'immagine dell'analizzatore è mostrata in **Figura 25**.



Figura 25. Analizzatore termogravimetrico NETZSCH STA 409PC

Le polveri di partenza sono state successivamente sinterizzate sotto vuoto (20Pa) per mezzo dell'apparecchiatura SPS (SPS 515S model, Sumitomo Coal Mining Co Ltd) riportata in **Figura 26**.

I campioni massivi ottenuti sono di forma cilindrica con 15mm di diametro e 3 mm di altezza.



Figura 26. Apparecchiatura SPS impiegata per il processo di sinterizzazione delle polveri di idrossiapatite

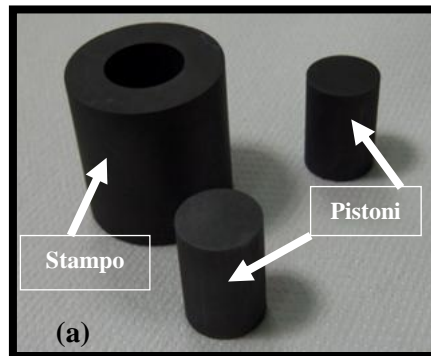
Il macchinario SPS permette di accoppiare un carico meccanico uniassiale fino a un carico massimo di 50 kN con una corrente elettrica pulsata prodotta da un generatore (10 V, 1500 A, 300 Hz).

Le polveri di **HAp** delle polveri (1.6 g) vengono disposte all'interno del porta campione in grafite AT101 (Atal s.r.l.) avente diametro interno di 15 mm, esterno di 35 mm ed altezza di 30 mm. L'impiego dei fogli in grafite con spessore di 0.13 mm, (Alfa Aesar Karlsruhe, Germany) permette di facilitare l'estrazione del campione a valle del processo di sinterizzazione.

Infine, il portacampione all'interno della camera viene avvolto da uno strato di 3 mm di feltro isolante in grafite (Atal s. r.l., Italia) al fine di limitare le perdite di calore verso l'esterno, limitando conseguentemente i gradienti di temperatura.

In **Figura 27** vengono riportate delle immagini relative allo stampo e ai pistoncini, visti

separatamente **(a)**, poi assemblati e avvolti dal feltro di grafite **(b)** nella tipica configurazione in cui viene preparato il campione da sottoporre a sinterizzazione.



Infine in **Figura 27 (c)** viene mostrato lo stampo reso incandescente a causa delle elevate temperature di sinterizzazione conseguenza dell'attraversamento della corrente elettrica. In questo caso l'esperimento è stato effettuato in assenza di feltro.

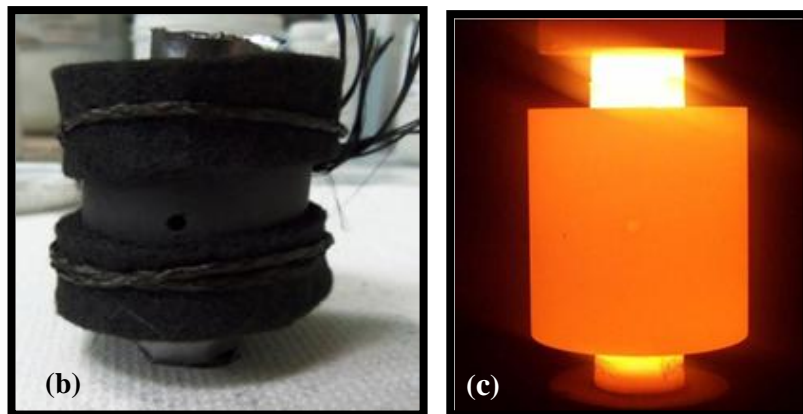


Figura 27. Immagini relative allo stampo e ai pistoni separati **(a)**, il sistema avvolto dal feltro di grafite **(b)**, porta campione incandescente durante un test SPS **(c)**

Durante il processo di sinterizzazione i parametri più importanti come la corrente, la tensione applicata tra i due elettrodi, e la loro distanza tipicamente indicata come “displacement” e il carico meccanico vengono registrati in tempo reale tramite una scheda di acquisizione dati che interfaccia l'apparecchiatura SPS con un computer dedicato.

Il displacement è un parametro che indica il grado di densificazione del campione durante il processo. Questo parametro è però influenzato anche dall'espansione termica subita dal porta campione e dagli elettrodi dell'apparecchiatura. Per poter tenere conto di questo contributo occorre seguire una procedura apposita [Locci et al., 2006], che permette di valutare più correttamente il grado di densificazione del campione (δ). La misura del livello di consolidamento raggiunto è però effettuata una volta concluso il processo, con una misura diretta della densità sul campione.

A seguito del processo SPS la corrente viene disattivata, il carico rilasciato e il campione fatto raffreddare a temperatura ambiente prima dell'estrusione. Ogni test viene riprodotto almeno due volte.

Il processo SPS avviene in controllo di temperatura, che viene misurata tramite termocoppia K (Omega Engineering Inc., USA) posizionata all'interno di un piccolo foro, ricavato in posizione centrale sulla superficie del porta campione.

Livelli termici superiori a circa 500°C possono essere anche rilevati tramite pirometro (CHINO, mod. IR-AHS2, Giappone), appositamente focalizzato sulla superficie esterna del die.

Lo studio dell'effetto della temperatura di sinterizzazione sulla densità dei campioni prodotti è stato effettuato mantenendo costanti i valori degli altri parametri, quali holding time ($t_D = 5$ min), carico meccanico ($P = 30$ MPa), e velocità di riscaldamento $75^\circ\text{C}/\text{min}$.

La densità relativa dei prodotti è stata valutata, in seguito alla loro lucidatura superficiale, tramite il metodo di Archimede, considerando la densità teorica di 3.16 g/cm^3 . I campioni sono stati quindi sottoposti ad indagini microstrutturali tramite microscopia elettronica a scansione, previa lucidatura e attacco chimico con HNO_3 al 3% in volume per un tempo di 10 secondi. I campioni più rappresentativi sono stati poi sottoposti a test meccanici, di indentazione con i quali sono stati ottenuti i valori di micro-durezza Vickers e modulo elastico locale. Per poter effettuare queste determinazioni, i campioni sono stati sezionati, inglobati su resina e opportunamente lucidati, seguendo gli standard metallografici. Le prove di indentazione sono state eseguite tramite il microdurometro a piattaforma aperta (CSM Instruments, Peseux, Svizzera) riportato in **Figura 28**.



Figura 28. Esempio di Micro-durometro usato per le prove di indentazione

Per le prove meccaniche è stato impiegato un indentatore tipo Vickers, utilizzando due carichi:

- Basso carico: carico massimo applicato : 0.50 N; velocità di applicazione: 0.75 N/min;
tempo di applicazione : 15 s;
- Carico elevato: carico massimo applicato : 2.00 N; velocità di applicazione: 3.00 N/min;
tempo di applicazione : 15 s.

Per poter eseguire una valutazione statistica dei risultati, in ciascun campione sono state effettuate 30 indentazioni. In queste caratterizzazioni la curva carico-penetrazione dell'indentazione ha permesso di ricavare il modulo elastico locale dei campioni considerati in accordo con il metodo di Oliver e Pharr il modulo elastico locale dei campioni considerati [Oliver e Pharr, 1992].

2.3 RISULTATI E DISCUSSIONE

2.3.1 Caratterizzazione delle polveri iniziali

I risultati ottenuti dalle prove granulometriche sono riassunti in **Tabella 3**. Per quanto riguarda **HAp_1** e **HAp_2**, mentre il terzo sistema **HAp_3** presenta una granulometria più grossolana.

System ID	d ₁₀ (μm)	d ₅₀ (μm)	d ₉₀ (μm)	Average size (μm)
HAp_1	1.2	4.9	17.2	7.1
HAp_2	1.3	5.1	13.4	6.3
HAp_3	8.8	34.0	52.0	32.7

Tabella 3. Caratteristiche granulometriche delle polveri iniziali di idrossiapatite

Queste caratteristiche vengono confermate dalle micrografie SEM, illustrate in **Figura 29**, dove è ben visibile come le particelle di **HAp_1** e **HAp_2** sono costituiti da aggregati di grani submicrometrici.

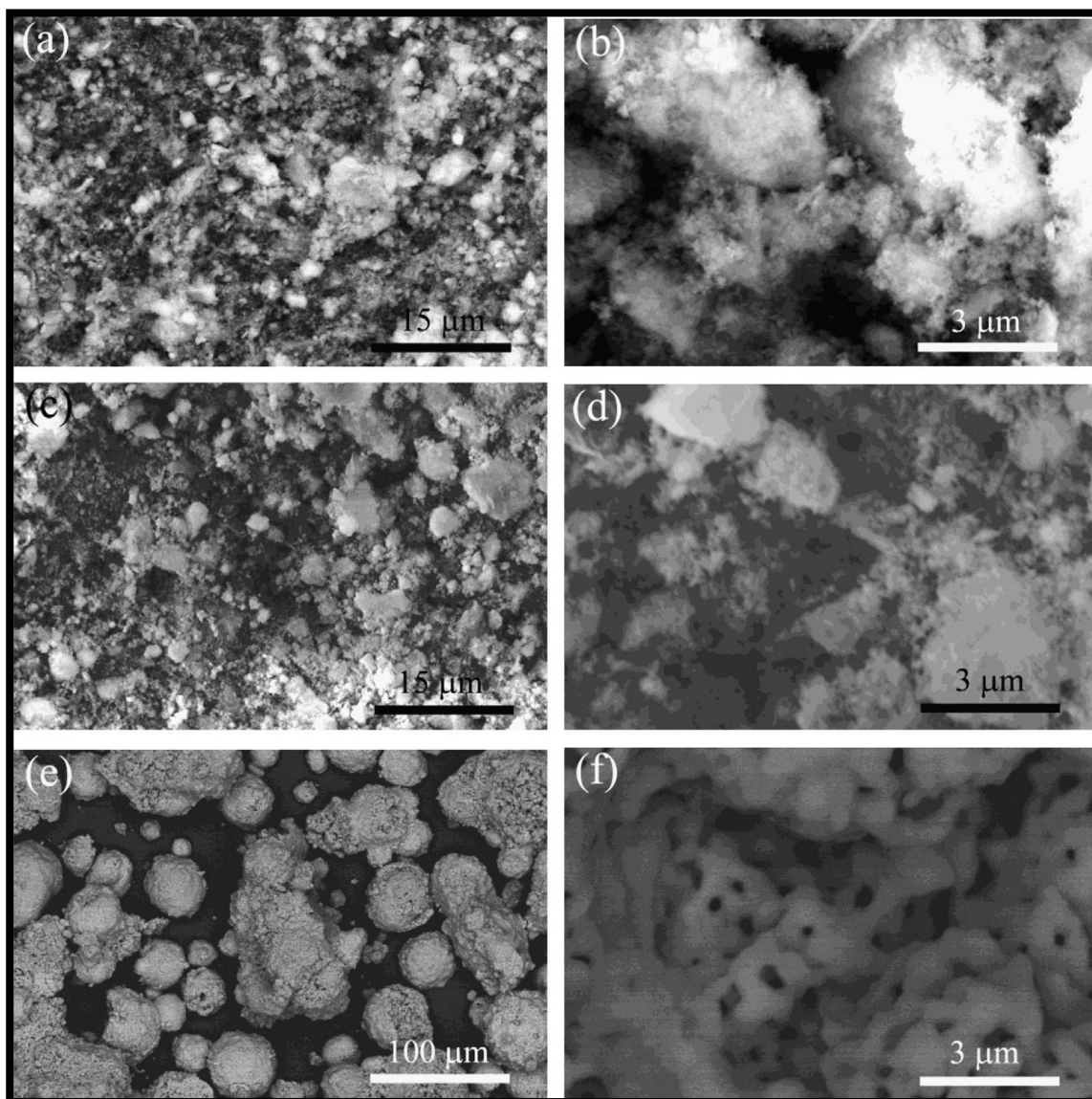


Figura 30. Immagini SEM a diversi ingrandimenti delle polveri iniziali di idrossiapatite (a)–(b) **HAp_1**, (c)–(d) **HAp_2** e (e)–(f) **HAp_3**

Viceversa il sistema **HAp_3** consiste di particelle con dimensione maggiori di 100 μm e struttura porosa, caratterizzata dalla presenza di pori di dimensioni di circa 100 nm.

In **Figura 30** sono confrontati i risultati dell'analisi XRD, che indicano per **HAp_3** e **HAp_2** la presenza della sola fase **HAp**, mentre per quello **HAp_1** anche di una quantità non trascurabile della fase CaHPO_4 . Per quanto riguarda la maggiore larghezza dei picchi relativi ai sistemi **HAp_1** e **HAp_2**, rispetto a quelli delle polveri **HAp_3**, questo può essere associato alla differente microstruttura, più fine nel primo caso.

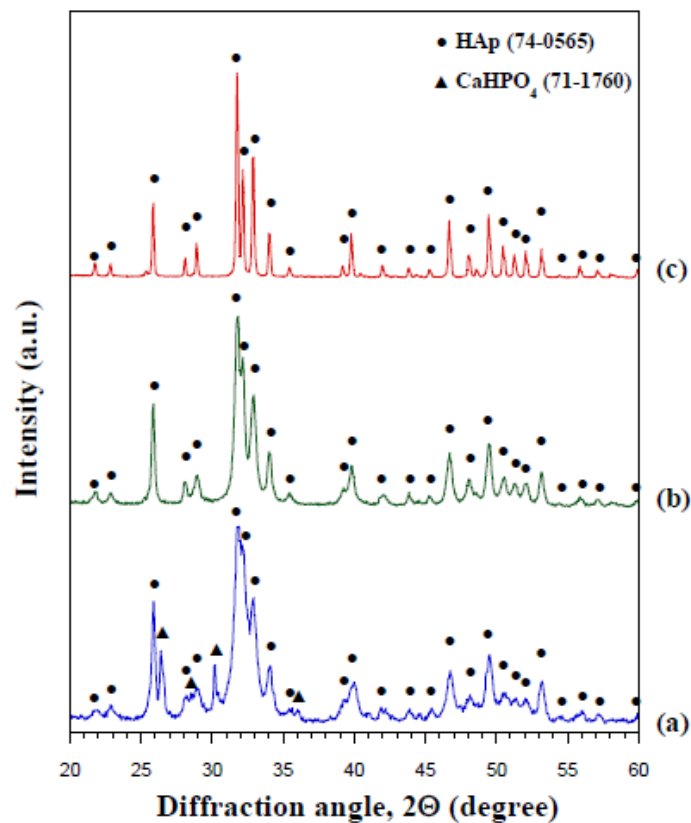
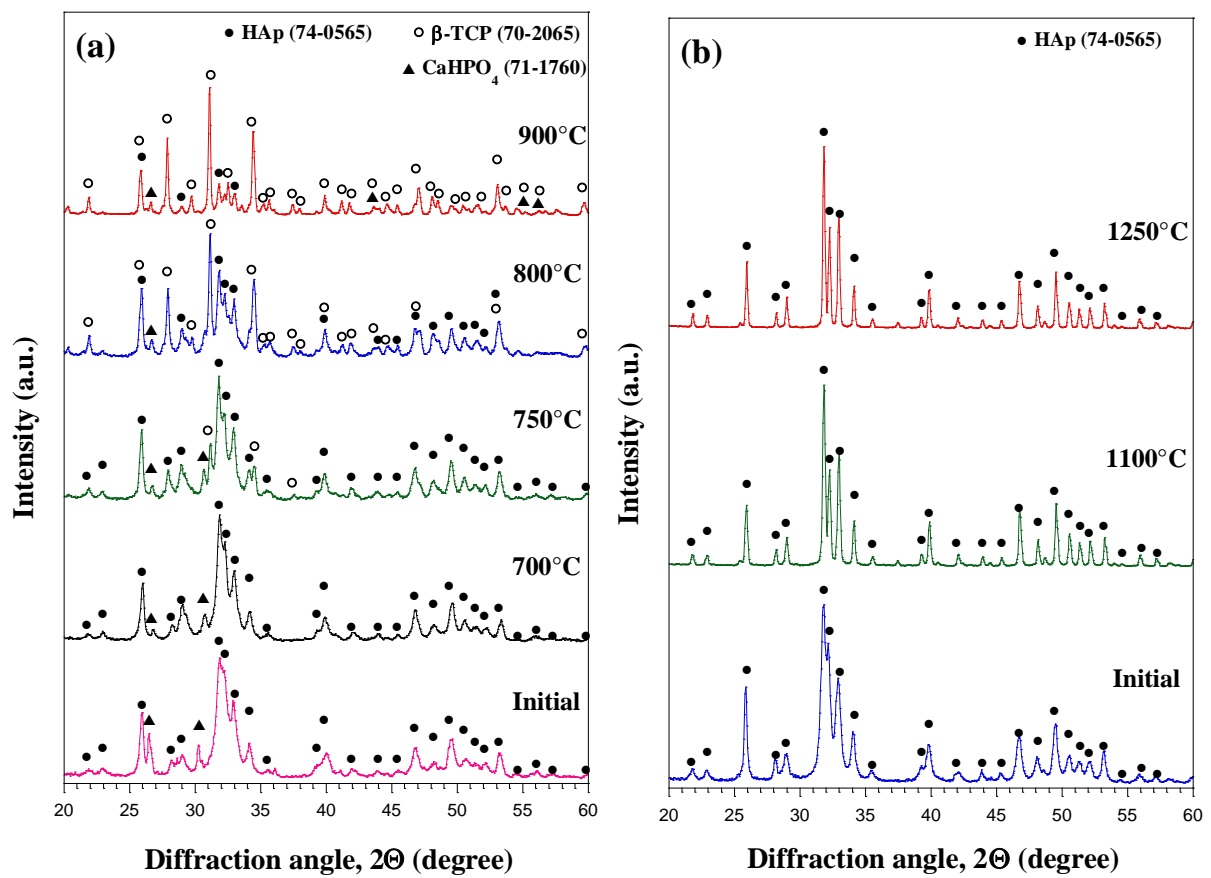


Figura. 31. Patterns XRD delle polveri iniziali di idrossiapatite: (a) **HAp_1**, (b) **HAp_2** e (c) **HAp_3**

Per valutare la stabilità termica delle polveri si è proceduto con i test in forno e rispettiva analisi XRD delle polveri risultanti, come riportato in **Figura 32 (a – c)**.



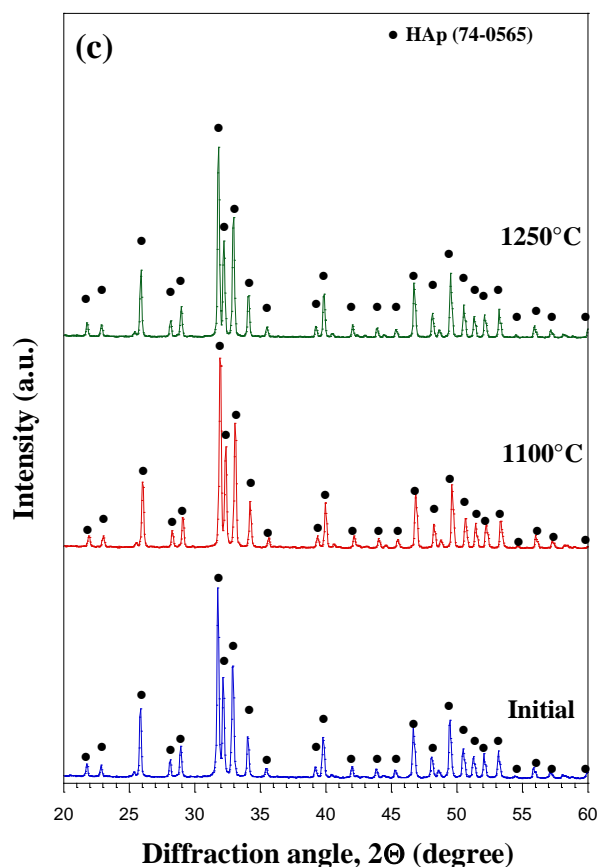


Figura 32. Effetto dei trattamenti termici in forno sulla composizione delle polveri di idrossiapatite (a) **HAp_1**, (b) **HAp_2** e (c) **HAp_3**

Per quanto riguarda il sistema **HAp_1**, per trattamenti condotti fino a 700°C non si osserva la presenza di fasi secondarie, mentre a temperature superiori a 750°C si verifica la formazione della fase β -TCP (romboedrica). È stato osservato inoltre che al crescere della temperatura di trattamento il contenuto di questa fase tende ad aumentare fino a 900°C, dove risulta come fase prevalente rispetto ad **HAp** e CaHPO_4 . Al contrario, in **Figura 32 (b) e (c)** è possibile notare la mancanza di fasi secondarie post trattamento per queste due polveri. Unica variazione riscontrabile al crescere della temperatura è il restringimento dei picchi relativi a **HAp_2**. Questo aspetto può essere

giustificato con una crescita del grano cristallino al crescere della temperatura del trattamento termico. Per completare l'analisi di stabilità termica sono state eseguite delle prove tramite termogravimetria, in quanto il forno consente di effettuare dei test fino a temperatura di 1300°C. Viceversa, con l'analisi TGA è stato possibile arrivare a temperatura di 1450°C. I risultati ottenuti, con riferimento alla perdita in massa del campione sono riportati come perdita in massa e rappresentato in **Figura 33** in funzione della temperatura.

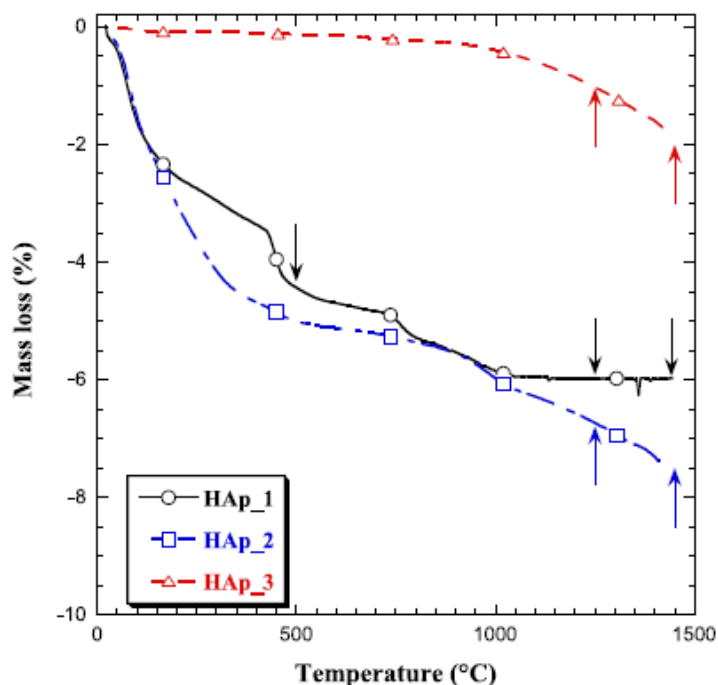
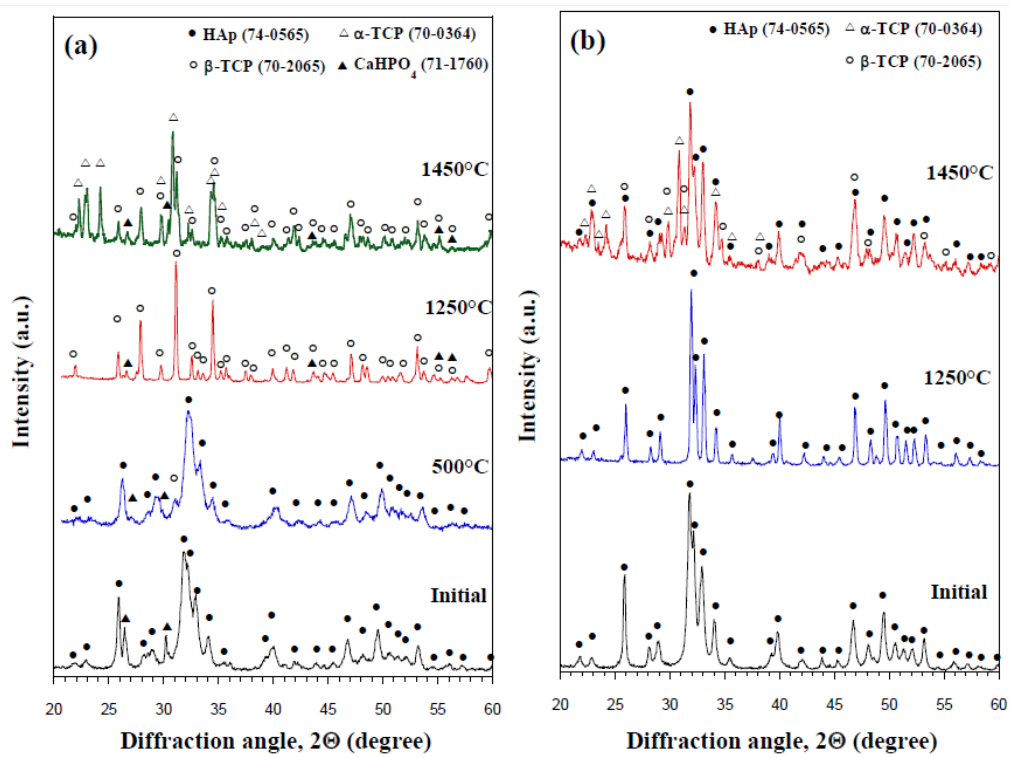


Figura. 33. Perdita in massa delle polveri iniziali di idrossiapatite durante i test TGA in aria

Dall'analisi di queste curve si nota una sostanziale differenza fra **HAp_3** dove si rileva una variazione significativa solo oltre i 1000°C, rispetto agli altri due sistemi in cui la perdita in massa non solo inizia già a bassi livelli di temperatura ma è anche 2 – 3 volte maggiore rispetto al primo.

Durante i test TGA è stato possibile tenere sotto controllo non solo la perdita in massa, ma anche le variazioni compositive delle polveri. Questo aspetto può essere esaminato sulla base dei risultati rappresentati in **Figura 33**. Per quanto riguarda il sistema **HAp_1** la formazione della fase β -TCP si manifesta già intorno ai 500°C, ossia immediatamente a valle del rapido cambiamento di pendenza della curva riportata in **Figura 32**.

Tuttavia, la più significativa variazione in peso verificatasi finora può essere associata probabilmente al fenomeno di deidrossilazione. Dai risultati dell'analisi XRD su **HAp_1** inoltre viene inoltre messa in evidenza come a 1250°C si verifica una considerevole decomposizione dell'**HAp** in β -TCP. Inoltre viene ancora riscontrata una piccola quantità di CaHPO_4 , peraltro già presente nelle polveri di partenza. Incrementando la temperatura a 1450°C, si ottiene la conversione della fase TCP dalla forma β a quella α (monoclina) e termodinamicamente stabile ad alte temperature. Questo fenomeno è conseguente col fatto che la forma β del TCP tenda trasformarsi in quella α per temperature tra 1120–1170°C [**Champion, 2013**]. Come mostrato in **Figura 34(b)** non si osservano picchi aggiuntivi di fasi secondarie per il sistema **HAp_2** a valle del test TGA effettuato a 1250°C. Questo testimonia la maggiore stabilità termica rispetto alle polveri **HAp_1**, ma anche che la variazione in peso osservata nei dati TGA per **HAp_2** possono essere attribuiti al fenomeno di deidrossilazione.



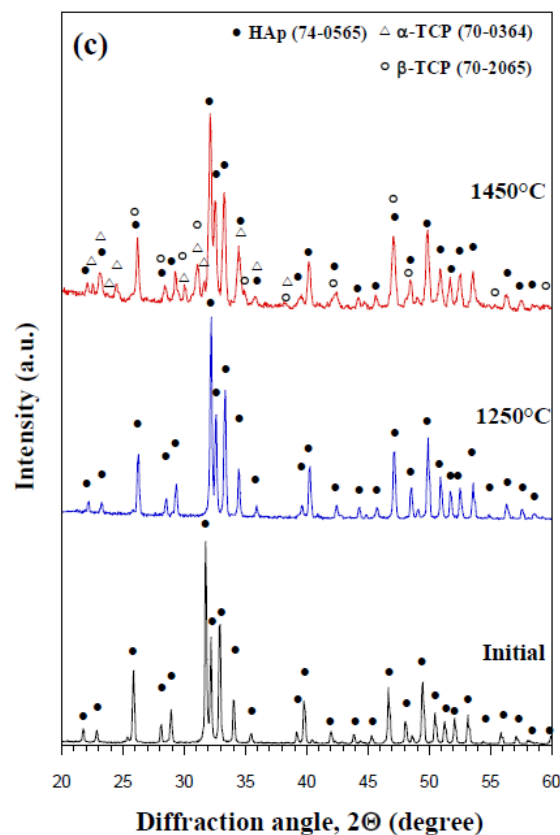


Figura 34. Variazione della composizione delle polveri di **HAp** durante i test TGA con condizioni (10°C/min) in aria (100 ml/min)

Tuttavia, quando la temperatura viene riportata a 1450°C, il prodotto **HAp** contiene una significativa quantità di TCP, in particolare nella forma α .

In sistema **HAp_3** ha un comportamento molto simile a quello di **HAp_2**, la differenza maggiore sta nella superiore stabilità termica del sistema **HAp_3**, per il quale non solo non si osserva formazione di TCP fino ai 1250°C, ma la fase secondaria che si presenta ai 1450°C, è in quantità molto inferiori rispetto al caso di **HAp_2**.

Sulla base dei trattamenti termici svolti sui tre sistemi è stato possibile evidenziare che **HAp_1** risulta meno stabile termicamente, in quanto si decompone già a basse temperature. Al contrario, **HAp_2** e **HAp_3** mostrano maggiore stabilità termica in quanto l'inizio della formazione di TCP si osserva solo per temperature superiori a 1250°C.

La perdita in peso maggiore per i sistemi **HAp_1** e **HAp_2** rispetto a **HAp_3** può essere imputabile alla minore dimensione delle polveri dei primi due rispetto al terzo in esame. Infatti, questo aspetto influisce sull'area superficiale delle particelle e facilita il fenomeno di deidrossilazione.

La differente stabilità termica mostrata dalle tre tipologie di polveri, così come evidenziato dalle relative temperature di decomposizione, dipendono da vari fattori, quali purezza delle polveri, granulometria, forma delle particelle, rapporto Ca/P e le condizioni di trattamento termico utilizzate [Cihlar et al., 1999, Liao et al., 1999, Graeve et al., 2010].

Per il sistema **HAp_1**, la decomposizione dell'idrossiapatite in β -TCP avviene a temperature relativamente basse, questo fenomeno può essere attribuito alla presenza della fase secondaria CaHPO_4 nelle polveri di partenza.

È importante tuttavia notare come tale trasformazione che avviene a circa 750°C, è in accordo con quanto osservato [Graeve et al., 2010].

Infatti nello studio citato non sono state riscontrate delle variazioni composizionali tramite XRD in seguito al trattamento a 600°C, mentre dopo quello a 800°C è stata rilevata la presenza di β -TCP.

In aggiunta in letteratura è riportato che se il rapporto calcio/fosforo è compreso tra 1.5 e 1.667 le

temperature di trasformazione **HAp** a β -TCP sono al di sopra dei 700°C [**Raynaud et al., 2002**]. Il fatto che i test TGA hanno mostrato che la formazione della fase β -TCP avviene già a 500°C, può essere attribuibile alle diverse condizioni del flusso d'aria, adottata nei due test TGA e forno.

La ragione per cui **HAp_2** e **HAp_3** hanno una stabilità termica maggiore, che evita l'insorgenza della decomposizione fino ai 1250°C, questo è probabilmente associabile alla più elevata purezza delle stesse. È opportuno notare come la presenza di α -TCP al di 1250°C è in accordo con la letteratura che indica come 1350-1400°C come intervallo in cui ha luogo la formazione di questa fase [**J. Cihlar et al., 1999, C.-J. Liao et al., 1999**].

2.3.2 Densificazione delle polveri tramite tecnica SPS

Un esempio dell'andamento nel tempo della temperatura e del grado di densificazione delle polveri di idrossiapatite durante il processo di sinterizzazione è riportato nella **Figura 35** relativamente al sistema **HAp_2**. Questi dati si riferiscono ad una temperatura di sinterizzazione $T_D=900^\circ\text{C}$, pari a 75°C/min come velocità di riscaldamento e carico meccanico $P=30\text{MPa}$.

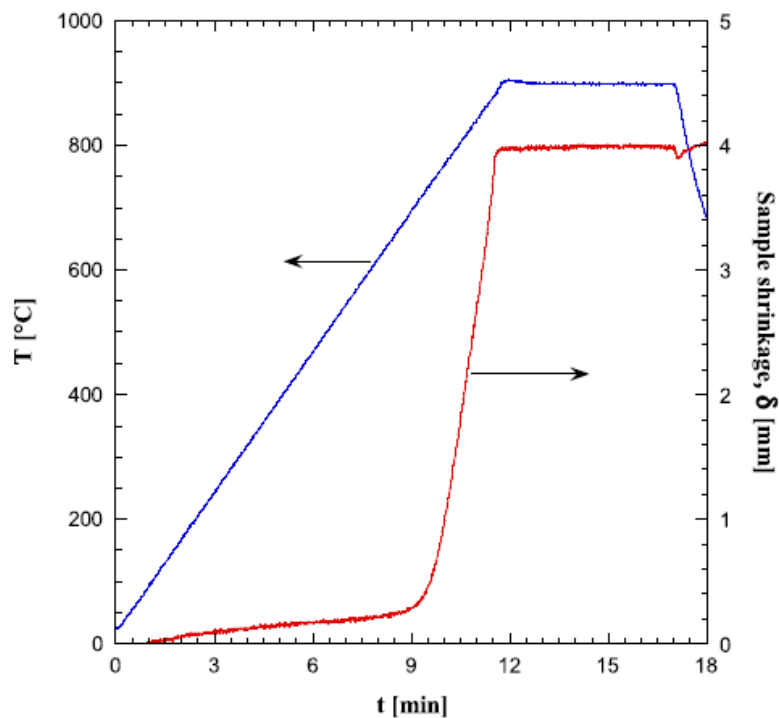


Figura 35. Esempio di andamento della temperatura e del grado di densificazione durante i test SPS di **HAp_2**

Il parametro δ , che indica il grado di densificazione, rimane praticamente invariato nella prima fase del processo, fino a temperatura di 700°C. Tuttavia, una volta superato tale livello di temperatura, si ha una variazione repentina di pendenza della curva di sinterizzazione che arriva ad un valore massimo pressochè costante del displacement pari a circa 4mm ($T=900^{\circ}\text{C}$). Un comportamento qualitativamente simile è stato riscontrato anche per gli altri sistemi **HAp** esaminati, per cui si possono fare considerazioni analoghe.

L'effetto della temperatura di sinterizzazione sulla densità dei prodotti ottenuti a partire dalle tre tipologie di polveri è mostrata in **Figura 36**.

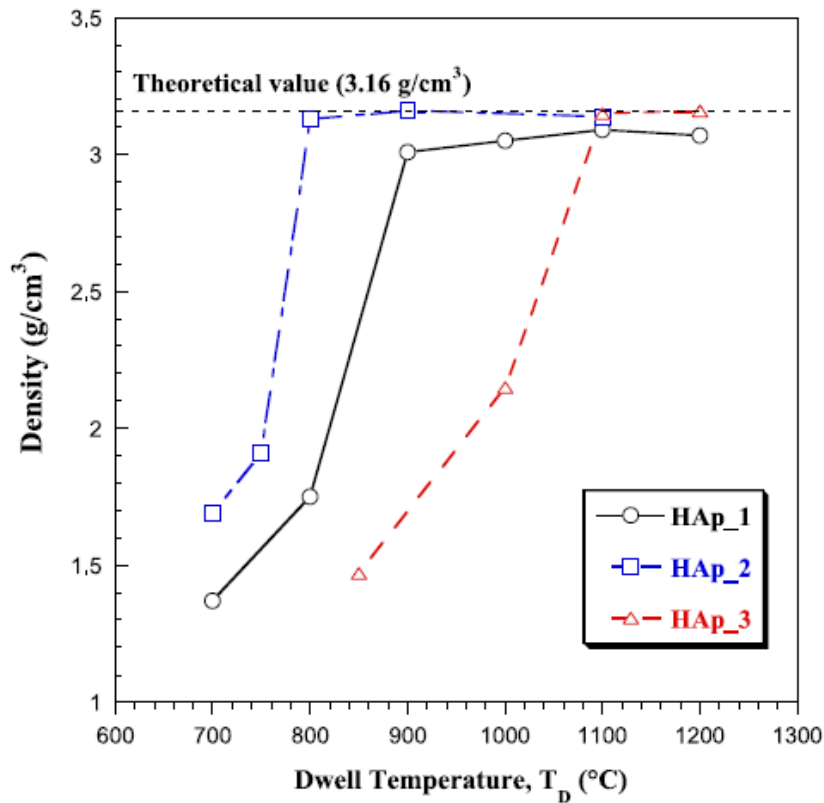


Figura 36. Influenza della temperatura di sinterizzazione sulla densità dei prodotti a base di HAp, (75°C/min, 30MPa, 5 min)

I grafici si riferiscono a test di densificazione svolti con carico meccanico di 30 MPa, tempo di sinterizzazione a T_D pari a 5 minuti e velocità di riscaldamento di 75°C/min.

Come atteso teoricamente all'aumento della temperatura in genere dovrebbe corrispondere una maggiore densificazione del campione prodotto. Tuttavia, la curva riportata nel grafico, osservando si può notare come il comportamento dei tre sistemi sia diverso. In particolare, quello di **HAp_2**

densifica più degli altri due sistemi sottoposti allo stesso ciclo termico e già a 800°C raggiunge quasi la densità teorica.

In particolare la temperatura richiesta per densificare totalmente le polveri di **HAp_2** è di 900°C mentre, per il sistema **HAp_3** lo stesso risultato si raggiunge solo a 1200°C. Relativamente al sistema **HAp_1** si osserva come a T=1200°C si ottengono dei valori di densità inferiori a quello teorico. Questo fatto può dipendere dalla presenza del TCP formatosi durante il processo di consolidamento, a spese dell'**HAp** che è la specie a cui è riferita la densità teorica.

In **Figura 37** sono riportati i confronti tra i risultati derivanti dalla caratterizzazione XRD delle polveri iniziali e quella dei prodotti ottimali post SPS. Per quanto riguarda **HAp_1** si può notare come il TCP si formi già a 700°C, quando il prodotto ha una densità inferiore al 50% **Figura 36**. Con l'aumento della temperatura a 800°C la maggiore decomposizione di **HAp** procede e quindi si verifica un incremento della fase secondaria. Questo incremento continua fino alla quasi completa conversione dell'**HAp** in β -TCP alla temperatura di 1200°C.

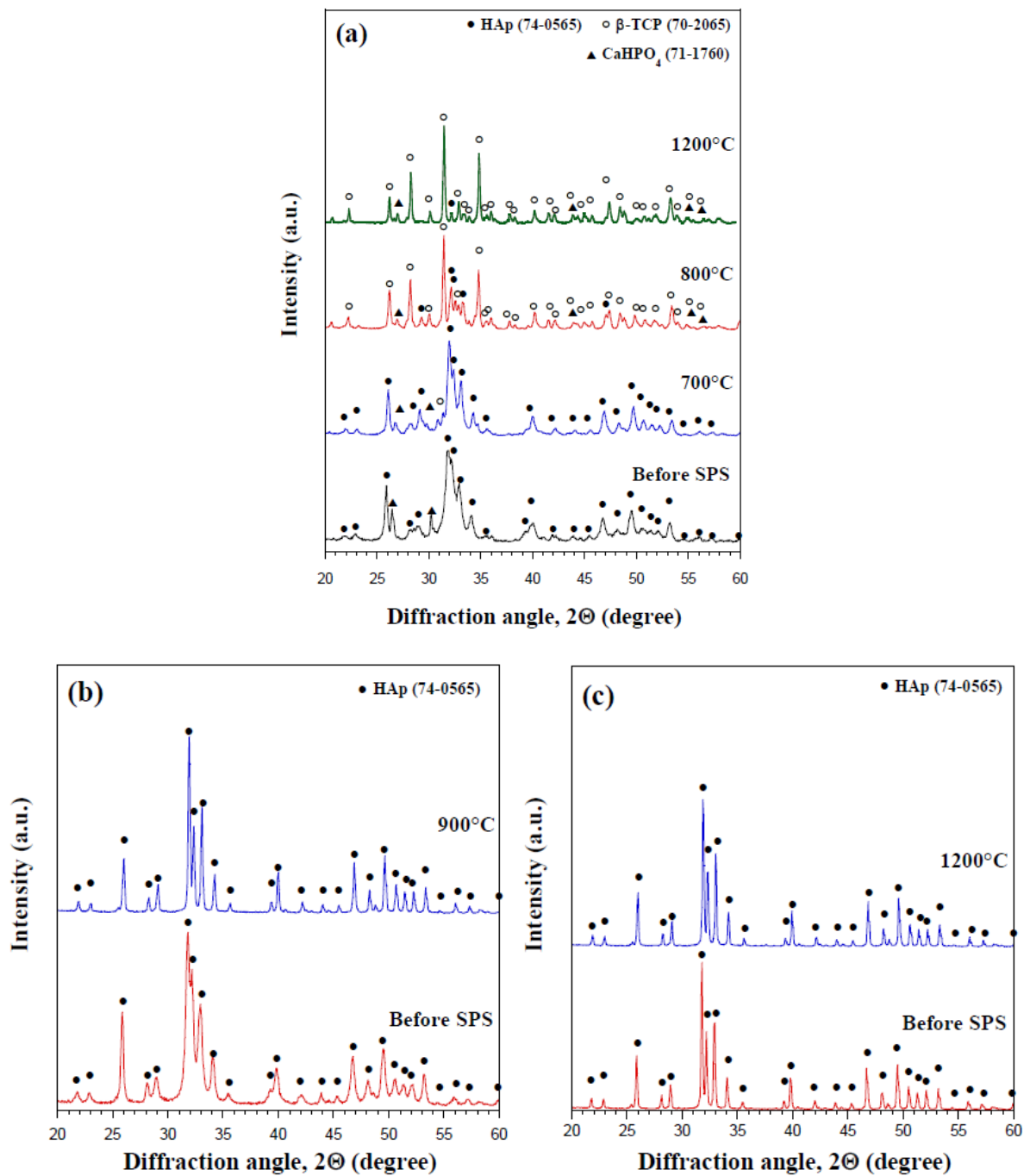


Figura 37. Confronto tra i diffrattogrammi ai raggi X dei diversi campioni di idrossiapatite sinterizzati a diverse temperature mediante SPS: (a) HAp_1, (b) HAp_2 e (c) HAp_3

Sempre con riferimento al sistema **HAp_1**, è inoltre riscontrabile la limitata presenza di CaHPO_4 , già presenti nelle polveri iniziali. Come detto in precedenza, i valori di densità ottenuti sono più bassi di quello teorico ottenuto dal sistema **HAP_1** sono da attribuire alla variazione composizionale del compatto durante il processo SPS.

Le altre due tipologie di polveri mostrano una maggiore stabilità termica, in accordo con i trattamenti termici precedentemente svolti sulle polveri iniziali. Infatti come riportato in **Figura 37** non si ha formazione di fasi secondarie per i prodotti ottimali risultanti dalla sinterizzazione dell'**HAp_2** e **HAp_3**.

Altre informazioni importanti sono state estrapolate dai dati di output della pressione del gas misurata all'interno nella camera di sinterizzazione. Durante ciascun test SPS la pompa da vuoto permette il mantenimento della pressione a circa 20 Pa, ma questo livello di pressione può variare se dal campione vengono sviluppati dei gas. In **Figura 38**, è evidenziato l'andamento registrato durante i test condotti nelle condizioni ottimali di sinterizzazione. Per i sistemi **HAp_1** e **HAp_2** si nota un incremento da 20 a 40 Pa intorno ai 200°C. questo può essere associato all'inizio del processo di deidrossilazione. Nel caso del sistema **HAp_1** si osserva un ulteriore aumento di pressione al tempo di 7 minuti. Questo avviene quando la temperatura del processo di consolidamento è di 500°C. Questo fenomeno può essere attribuito all'inizio della trasformazione **HAp** --> **β -TCP**. Questa affermazione è supportata dal fatto che anche le analisi XRD delle polveri sottoposte a TGA, mostrano in **Figura 33** che a 500°C si ha l'incipiente formazione della fase

secondaria sopracitata. Inoltre si sottolinea come durante tutto il test di consolidamento del sistema **HAp_1** si abbiano livelli di pressione più elevati rispetto agli altri due e questo fatto può essere senz'altro è attribuito alla decomposizione dell'**HAp** in β -TCP, come è confermato dalla caratterizzazione tramite raggi X a valle del processo di sinterizzazione.

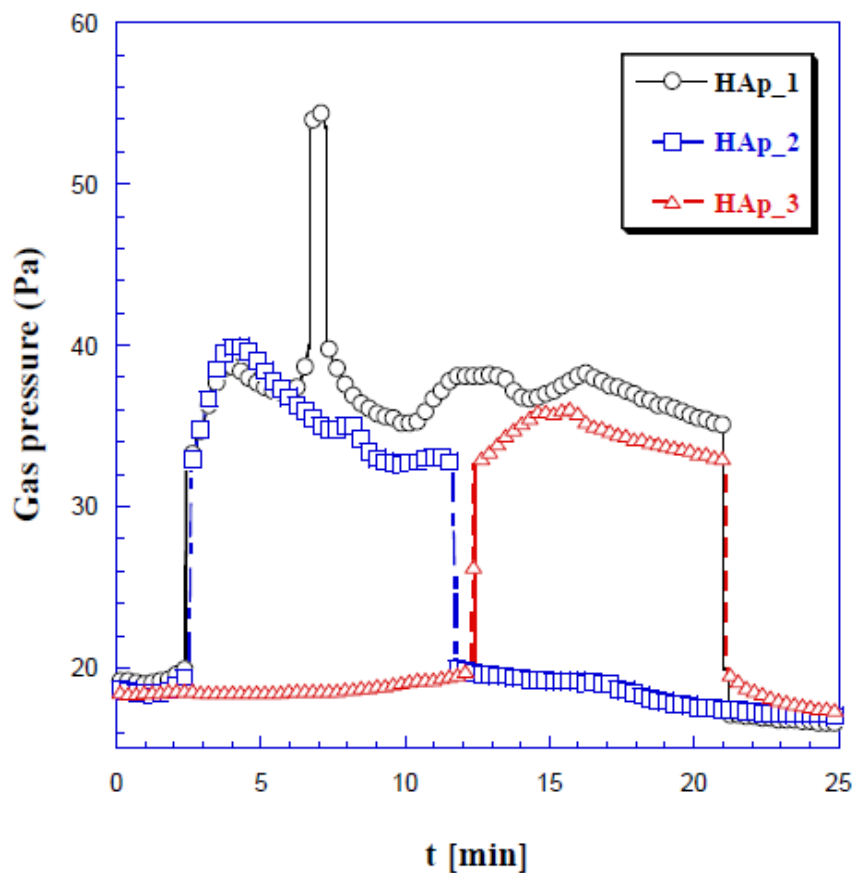
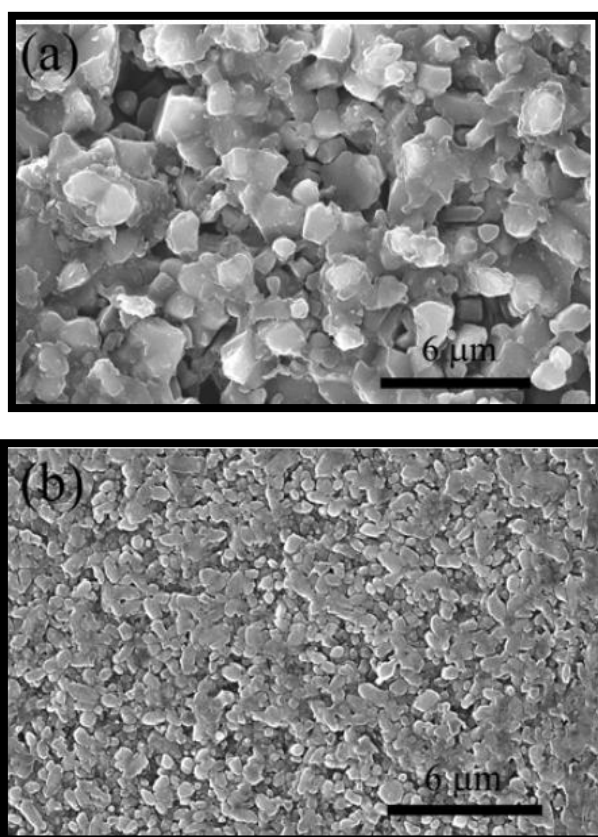


Figura 38. Andamento temporale della pressione ei gas all'interno della camera SPS durante le prove condotte in condizioni ottimali

Per il sistema **HAp_2** la pressione dapprima aumenta, poi decresce lentamente per poi riportarsi al livello della pressione iniziale intorno ai 12 minuti dall'inizio del test. Sulla base dei risultati XRD è

possibile affermare che per questo sistema lo sviluppo di gas è dovuto esclusivamente al fenomeno di deidrossilazione. L'andamento della pressione per il sistema **HAp_3** conferma la sua maggiore stabilità termica. Infatti, a differenza dei primi due, l'evidenza dello sviluppo di gas si manifesta solo al di sopra dei 1000°C. questo fatto è in accordo con i risultati TGA mostrati in **Figura 34** a conferma della maggiore stabilità termica del sistema **HAp_3** rispetto agli altri due sistemi considerati. In **Figura 39 (a-c)** sono riportate le micrografie SEM dei campioni densi ottenuti dalle tre polveri iniziali nelle condizioni ottimali di sinterizzazione. Allo scopo di rendere più evidente la microstruttura che caratterizza il prodotto ottenuto, i campioni sono stati sottoposti ad attacco chimico con una soluzione di HNO_3 , come descritto nella sezione 2.2.



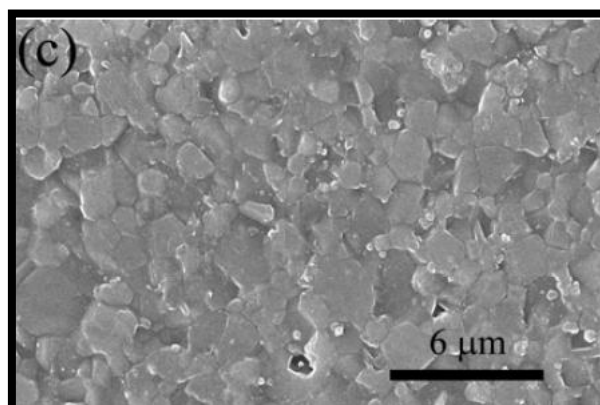


Figura 39. Micrografie SEM delle superfici dei prodotti densi ottimali in seguito a attacco chimico (a) **HAp_1**, (b) **HAp_2** e (c) **HAp_3**

Tali micrografie indicano che il campione **HAp_1** è formato da grani di β -TCP aventi dimensioni che vanno da 1-3 μm . si può osservare come questo sistema risulta più sensibile all'attacco chimico con HNO_3 rispetto agli altri materiali. Questo risultato conferma il fatto che il prodotto **HAp_1**, ricco di TCP sia meno resistente ad un ambiente aggressivo, rispetto a quelli costituiti da sola **HAp**.

Le indagini SEM hanno inoltre evidenziato come i prodotti densi di **HAp_2** presentano una microstruttura più fine rispetto agli altri. Viceversa, il sistema **HAp_3** mostra una microstruttura più grossolana costituita da grani di dimensioni 1-3 μm .

La differenza riscontrata in termini microstrutturali è principalmente da imputare alle caratteristiche granulometriche delle polveri iniziali, che giustificano anche le più blande condizioni di sinterizzazione richieste per consolidare il sistema **HAp_2**.

In **Figura 40**, sono riportate tre fotografie dei campioni ottimali densi ottenuti per ciascun sistema e aventi spessore di 2.4 mm.

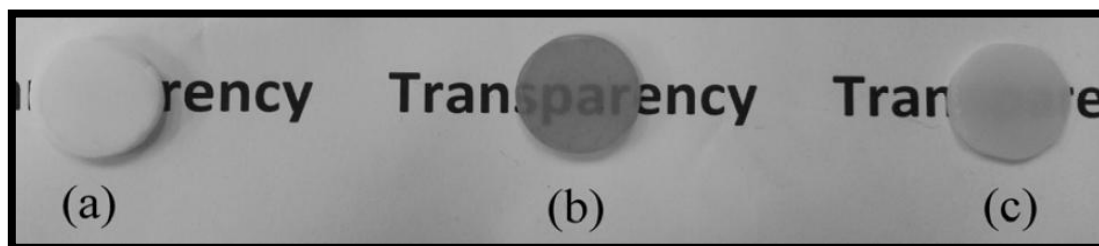


Figura 40. Immagini dei prodotti densi ottenuti in condizioni ottimali di sinterizzazione (a) **HAp_1**, (b) **HAp_2**, (c) **HAp_3**

Il prodotto **HAp_2** mostra maggiore trasparenza rispetto ad **HAp_3** e **HAp_1**, che risulta il campione più opaco. Quanto osservato è in accordo con le caratteristiche, riguardanti la minore dimensione delle polveri **HAp_2** e soprattutto, il fatto che questo sistema non si decompone durante il processo di compattazione. Tutto ciò non accade per il sistema **HAp_1**, dove la trasparenza del campione è veramente modesta a causa delle trasformazioni chimiche che avvengono durante la fase di sinterizzazione. Infine per quanto riguarda il sistema **HAp_3**, non vengono identificate fase secondarie, la minor trasparenza del prodotto è giustificata dalla microstruttura più grossolana.

2.3.3 Caratterizzazioni Meccaniche

In **Figura 41(a)** e **(b)** sono riportati due esempi di impronte lasciate durante le prove di indentazione eseguite rispettivamente con 0.5 N e 2.0 N di carico per il campione **HAp_2**. I test sono stati effettuati sulla sezione trasversale dei campioni, successivamente alla loro pulitura e lucidatura.

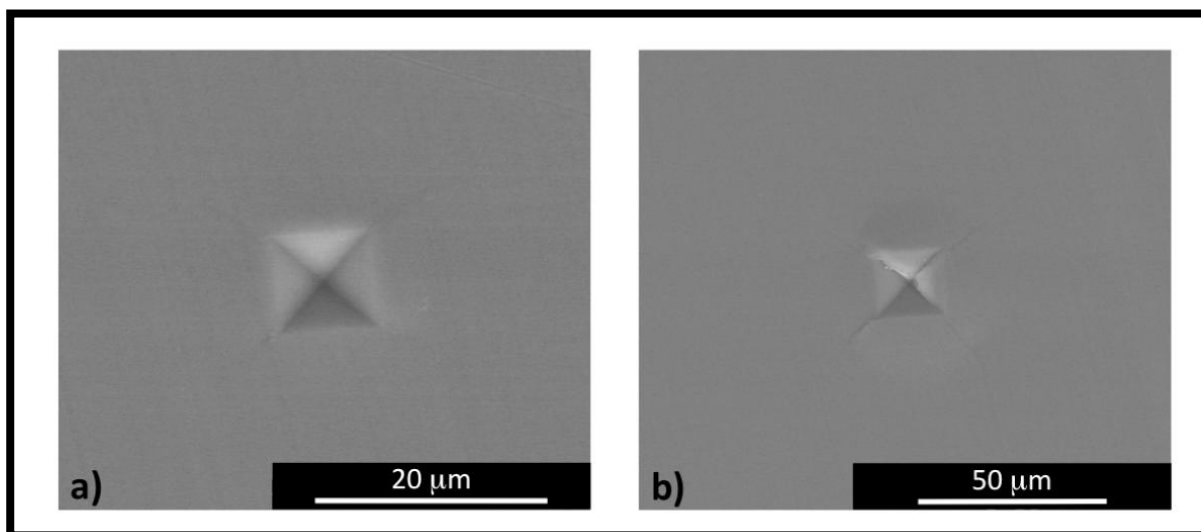


Figura 41. Impronta residua derivante dai test di indentazione eseguiti sulle sezioni con carico 0.5 e 2.0 N sul sistema **HAp_2**

I risultati ottenuti per tutti e tre i sistemi sono riportati in **Figura 42**. È possibile osservare una lieve diminuzione della microdurezza con l'aumento del carico da 0.5 a 2.0 N. Questo risultato è in accordo con il noto **ISE** “Indentations Size Effect” [Milman et al., 2011].

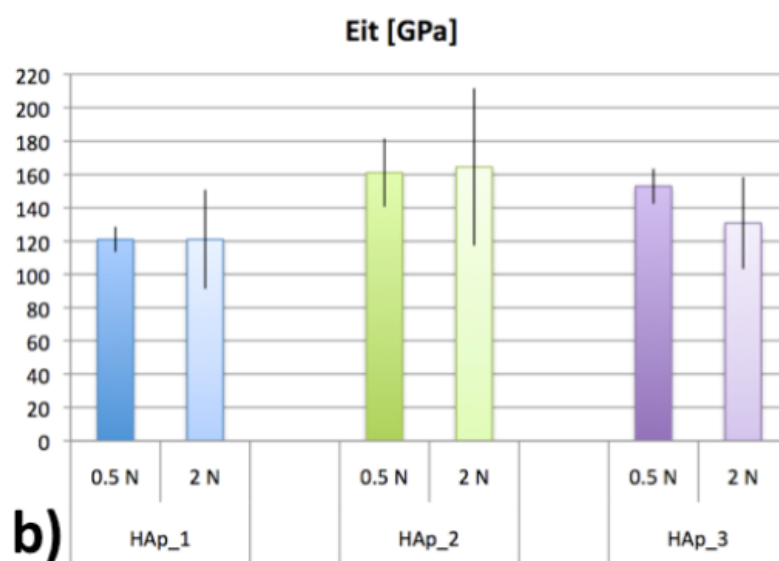
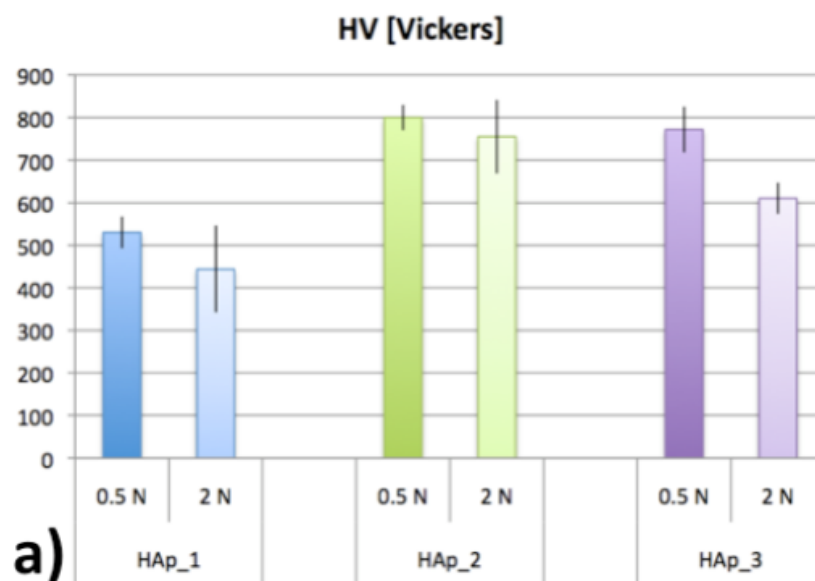


Figura 42. Micro durezza **(a)** e modulo elastico locale **(b)** determinati con i test di indentazione eseguiti sui tre sistemi di **HAp**

Il modulo elastico locale si dimostra meno sensibile al carico applicato soprattutto per i campioni **HAp_1** e **HAp_2**, come mostrato in **Figura 41 (b)**. Indipendentemente dal carico applicato, le migliori proprietà meccaniche locali sono quelle del sistema **HAp_2**. Questo può essere attribuito alla composizione e alla microstruttura del prodotto ottenuto, in accordo con quanto evidenziato in precedenza. In particolare le scarse proprietà meccaniche messe in evidenza dai test sul campione **HAp_1** rispetto agli altri sistemi, sono giustificate dalla trasformazione chimica derivante dal processo SPS avvenuta, con la decomposizione di **HAp** in β -TCP, come pure dal fatto che non si sia raggiunta la completa densificazione.

È comunque importante notare come i risultati ottenuti sono assolutamente confrontabili con ciò che è stato ottenuto in letteratura testando campioni sinterizzati con altri metodi [**Ramesh et al., 2013**].

Per esempio, [**Ramesh et al., 2013**] hanno riportato valori di durezza pari a 50–700 HV, per campioni densi di **HAp** ottenuti impiegando tecniche differenti. Inoltre campioni di **HAp** dopati con Stronzio e sinterizzati a 1200°C hanno dato valori di durezza nell'intervallo 200-500 HV. Anche i valori di modulo elastico sono analoghi a quelli (115GPa) riportati nello studio di [**Gilmore et al., 1982**].

Capitolo 3

Sinterizzazione di polveri di vetri bioattivi

3.1 INTRODUZIONE

Grazie alla favorevole risposta riscontrata nell'interazione con i tessuti biologici, negli ultimi tempi il Bioglass® ed i materiali da esso derivanti hanno acquisito sempre maggiore interesse e sono divenuti oggetto di diversi studi che ne consentono un loro impiego diffuso per applicazioni in campo biomedico [Hench, 2006; Boccaccini et al., 2007]. Come accennato nel capitolo introduttivo, la risposta positiva è conseguenza di fenomeni chimico-fisici che intervengono all'interfaccia tra biovetro e fluidi biologici, con la formazione di uno strato di **HCA** (idrossiapatite carbonata) che rappresenta l'interfaccia ideale con la quale il materiale a base di biovetro si può legare strettamente ai tessuti biologici [Filho et al., 1996].

È ben risaputo che le proprietà meccaniche e la risposta biologica del biovetro dipendono fortemente dalla relativa composizione, ossia dal tipo e contenuto di ossidi presenti, oltre che dalle condizioni di sinterizzazione che subiscono le polveri per l'ottenimento del materiale massivo.

In tale ambito, è opportuno notare che uno degli aspetti fondamentali che deve essere tenuto sotto controllo è la tendenza del materiale a cristallizzare durante i trattamenti termici. Infatti, frazioni elevate di fase cristallina presenti nella matrice vetrosa potrebbero influire negativamente sulla bioattività del materiale..

In particolare, durante i test condotti in soluzione **SBF** (simulated body fluids) è stato osservato definitivamente che il tempo di formazione dello strato di **HCA** sulla superficie del biovetro cresce all'aumentare della fase cristallina presente [Li et al., 1992; Filho et al., 1996]. Allo stesso tempo la parziale presenza di una fase cristallina nel materiale a matrice amorfa può rappresentare un vantaggio dal punto di vista delle caratteristiche meccaniche. Questo aspetto può essere sfruttato per modulare le caratteristiche del materiale massivo e ottimizzare le relative proprietà meccaniche e biologiche.

Il capostipite della classe dei biovetri è stato sviluppato da Hench, spesso indicato come biovetro 45S5 chiamato Bioglass®, è caratterizzato dalla seguente composizione (percentuali in peso) 45% SiO₂, 24.5% Na₂O, 24.5 % CaO e 6 % P₂O₅. Purtroppo il Bioglass® possiede una spiccata tendenza a cristallizzare, avendo una temperatura di cristallizzazione piuttosto bassa, nell'intervallo 550-650°C, e comunque inferiore ai livelli termici necessari per ottenere prodotti densi senza applicazione di carico meccanico [Lefebvre et al., 2008; Bretcanu et al., 2009]. D'altro canto, se si utilizzano temperature inferiori a quelle di cristallizzazione, si ottengono dei prodotti porosi e con proprietà meccaniche scarse.

Per arginare le sudette criticità, attualmente si cerca da un lato di ricorrere a tecniche di sinterizzazione più efficienti, che richiedano condizioni di temperatura meno drastiche, come pure vengono studiate delle tecniche di densificazione e delle composizioni differenti dei biovetri rispetto al Bioglass® per limitare il fenomeno di cristallizzazione.

Una delle tecniche di densificazione che offre particolari vantaggi in tal senso è quella SPS (Spark Plasma Sintering), che permette di densificare materiali ceramici tramite l'applicazione di carico un meccanico e il contemporaneo passaggio di una corrente elettrica pulsata [Orrù et al., 2009].

L'alta efficacia di questa tecnica è legata alla facilità con la quale le polveri di ceramico vengano portate ad alte temperature grazie all'effetto Joule generato dal passaggio della corrente che attraversa il porta campione elettricamente conduttivo, costituito interamente costituito da grafite.

Per effetto della rapidità con la quale avviene il riscaldamento delle polveri, durante il processo SPS sono necessarie condizioni di sinterizzazione più blande e dei tempi inferiori. Entrambi questi aspetti giocano un ruolo positivo per limitare il fenomeno della cristallizzazione, come confermato da vari studi condotti sul materiale 45S5 Bioglass® [Chen et al., 2012; Grasso et al., 2013; Porwal et al., 2014] o in combinazione con altre fasi [Guo et al., 2004; Jia et al., 2011; Porwal et al., 2014].

Per quanto riguarda invece la possibilità di far ricorso ad una differente composizione del vetro bioattivo, è stato dimostrato come l'aumento del quantitativo di CaO, a spese di Na₂O, porti ad un aumento della temperatura di inizio cristallizzazione [Lockyer et al., 1995]. In questo contesto, sono stati recentemente identificate delle composizioni innovative di biovetro, particolarmente

ricche di CaO e contenenti K₂O [Bellucci et al. 2011a, 2011b]. Tali biovetri hanno mostrato una capacità di mantenere la propria natura amorfa per temperature di 800°C durante i test di sinterizzazione condotti fino a 3h in assenza di carico meccanico.

In questo capitolo verrà confrontato il comportamento del convenzionale 45S5 Bioglass® con quello di un biovetro innovativo ricco di CaO e contenente K₂O durante dei test di sinterizzazione condotti mediante la tecnica SPS. Preliminarmente le polveri di partenza sono state caratterizzate tramite diverse tecniche sperimentali come XRD, microscopia elettronica a scansione SEM e termogravimetria TGA/DTA. Relativamente alle prove SPS è stato eseguito uno studio sistematico sull'effetto del tempo di sinterizzazione, delle temperature e del carico meccanico applicato nei riguardi della densità e del grado di cristallizzazione dei campioni prodotti. Questi ultimi sono stati poi confrontati dal punto di vista meccanico.

3.2 PARTE SPERIMENTALE

La composizione chimica delle due tipologie di biovetro presi in considerazione è riportata in **Tabella 4**. In particolare si tratta del **Bioglass® 45S5** (Cod. GL0160P) fornito da Mo-Sci Corp. (USA), indicato come **Bioglass® 45S5** e di quello **BG_Ca/Mix**, ricco in CaO e contenente K₂O che è stato prodotto presso il dipartimento di Ingegneria dei materiali Enzo Ferrari dell'Università di Modena Reggio Emilia [Bellucci et al., 2012].

Tabella 4 . Composizione delle polveri di biovetro studiate nel presente lavoro

Tipo di biovetro	SiO₂ [% peso]	Na₂O [% peso]	CaO [% peso]	P₂O₅ [% peso]	K₂O [% peso]
BG_45S5	43-47	22.5-26.5	22.5-26.5	5.0-7.0	-
BG_Ca/Mix	46.9	2.4	42.2	6.1	2.4

La preparazione del **BG_Ca/Mix** consiste in diverse fasi. Prima di tutto è stato necessario procedere con la pesata dei reagenti. La miscela di partenza costituita da: SiO₂, Ca₃(PO₄)₂, SiO₂, Na₂CO₃, CaCO₃ e K₂CO₃ pesati in opportune proporzioni, è stata dapprima trasferita all'interno di un semplice contenitore di forma cilindrica in materiale plastico, con tappo avvitabile per la miscelazione. Questa ha avuto luogo disponendo il contenitore sopra due rulli in rotazione tramite un motore elettrico (Motore elettrico Capparelli M36a4 Bologna (Bo)). Questo processo di miscelazione ha una durata di sei ore circa. La preparazione del vetro viene eseguita tramite il forno ad ascensore rappresentato in **Figura 43 e** prevede le seguenti fasi di riscaldamento: nella prima si passa dalla temperatura ambiente a 500°C alla velocità di 5°C/min, mentre, durante la fase successiva la rampa termica arriva sino a 1100°C alla velocità di 10°C/min. Questa temperatura si mantiene per circa un'ora, dopo la quale si ha un ulteriore aumento della temperatura sino al raggiungimento di 1450°C, sempre alla stessa velocità di 10°C/min .



Figura 43. Forno ad ascensore Lenton utilizzato presso i laboratori dell'Università di Modena-Reggio Emilia per la preparazione del **BG_Ca/ix**

Una volta raggiunta la temperatura di 1450°C il fuso viene raffreddato istantaneamente in acqua (“quenching” o frittaggio), per bloccare possibili fenomeni di cristallizzazione

Il materiale ottenuto da questo processo è mostrato in **Figura 44.**



Figura 44. Fritte di Biovetro **BG_Ca/Mix**

Successivamente il biovetro viene deposto in stufa a 110°C per circa 12 ore, con lo scopo di allontanare l'umidità acquisita durante il frittaggio. Inoltre, per poter utilizzare il prodotto nel processo di sinterizzazione occorrerà procedere all'opportuna macinazione dello stesso.

La differenza principale nella composizione dei due tipi di biovetro è relativa al rapporto $\text{CaO}/\text{Na}_2\text{O}$ che per il Bioglass® 45S5 è di circa 1, mentre per il biovetro innovativo è di 17.6; inoltre quest'ultimo presenta una percentuale di 2.4 % in peso di K_2O . Poiché questa tipologia di biovetro è stata messa a punto in uno studio precedente nel quale era stato indicato come **BG_Ca/Mix** si è deciso di adottare anche qui la stessa denominazione [Bellucci et al., 2012].

Le due tipologie di polveri hanno subito dapprima una dettagliata analisi granulometrica tramite un analizzatore di diffusione laser (CILAS 1180, France).

Inoltre, le polveri iniziali, come pure quelle derivanti dai vari trattamenti termici subiti sono state sottoposte a caratterizzazione tramite analisi di diffrazione ai raggi X tramite (Philips PW 1830) dotato di tubo a target in Cu avente radiazione K_{α} filtrata ($\lambda=1.5405 \text{ \AA}$). Infine la morfologia delle polveri è stata esaminata tramite microscopio elettronico a scansione (SEM)

La stabilità termica dei due materiali è stata valutata mediante analisi termogravimetrica accoppiata con quella termica differenziale (TGA/DTA). I test sono stati condotti con velocità di riscaldamento tra $5\text{-}50^{\circ}\text{C}/\text{min}$, da temperatura ambiente fino a 1000°C e con flusso d'aria di $100\text{mL}/\text{min}$ utilizzando l'analizzatore **NETZSCH STA 409PC**.

Come nel caso dello studio sull'idrossiapatite, anche i biovetri sono stati sinterizzati mediante SPS in campioni cilindrici di 15mm di diametro e spessore 3mm (515S model, Sumitomo Coal Mining Co Ltd) . La camera di sinterizzazione è stata continuamente evacuata durante le prove al fine di mantenere una pressione di circa 20 Pa .

Il programma di sinterizzazione per i biovetri prevedeva due velocità di riscaldamento: $50^{\circ}\text{C}/\text{min}$ da temperatura ambiente a 100°C al di sotto di T_D , dopodiché $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ fino a T_D fino a T_D .

Questo livello di temperatura viene mantenuto per un tempo t_D compreso tra 0 e 2 min . La fase di raffreddamento consiste nell'abbassare la temperatura da T_D a 300°C con una velocità di $50^{\circ}\text{C}/\text{min}$ e con carico meccanico di 16MPa . Una volta raggiunti i 300°C l'erogazione di corrente viene disattivata, così pure il carico meccanico e il raffreddamento procede fino al raggiungimento della temperatura ambiente.

I campioni sinterizzati sono stati caratterizzati da un punto di vista strutturale grazie alla diffattrometria a raggi X e alla microscopia elettronica a scansione. Le indagini SEM sono state condotte previo attacco acido della superficie con una soluzione 1% in volume di HF, per un tempo di 30 secondi. I campioni di biovetro ottenuti mediante SPS sono stati caratterizzati dal punto di vista meccanico per poter ottenere la relativa micro durezza ed il modulo elastico locale, entrambe ottenute mediante tecniche di indentazione. Per quanto riguarda il modulo elastico locale, si è fatto ricorso al metodo di Oliver-Pharr [**Oliver e Pharr, 1992**]. Per ciascun campione di biovetro sono state effettuate almeno 10 indentazioni. Il carico massimo applicato è stato pari a 1N, la velocità di applicazione di 1.5 N/min e la durata 15 s.

3.3 RISULTATI E DISCUSSIONE

3.3.1 Caratterizzazione delle polveri Iniziali

La caratterizzazione granulometrica e l'analisi SEM hanno permesso di mettere in evidenza la differenze delle polveri di partenza in termini di granulometria e morfologia,. In particolare dalla **Tabella 5** si evince come il **BG_45S5** abbia una granulometria più fine con particelle di dimensione in genere minori di 5 μm , mentre il **BG_Ca/Mix** mostra una granulometria con valori per di più al di sotto dei 20 μm .

Tabella 5 . Dimensioni delle particelle (μm) delle polveri di biovetro

Sistema	d-10	d-50	d-90	dmedio
BG_45S5	0.70 \pm 0.04	2.28 \pm 0.18	12.34 \pm 1.02	4.51 \pm 0.33
BG_Ca/Mix	1.50 \pm 0.04	15.03 \pm 1.26	45.58 \pm 2.89	19.88 \pm 1.41

Questi dati sono in accordo con quanto osservato nelle micrografie SEM riportate in **Figura 45**; nello specifico nella **Figura 45(a)** è possibile vedere come la maggior parte del **BG_45S5** sia costituito da particelle con dimensione tra 1 e 2 μm ma anche sub micrometriche. Viceversa le polveri di **BG_Ca/Mix** sono più grossolane, con particelle con dimensioni in genere inferiori ai 5 μm sebbene sia presente anche una frazione più fine.

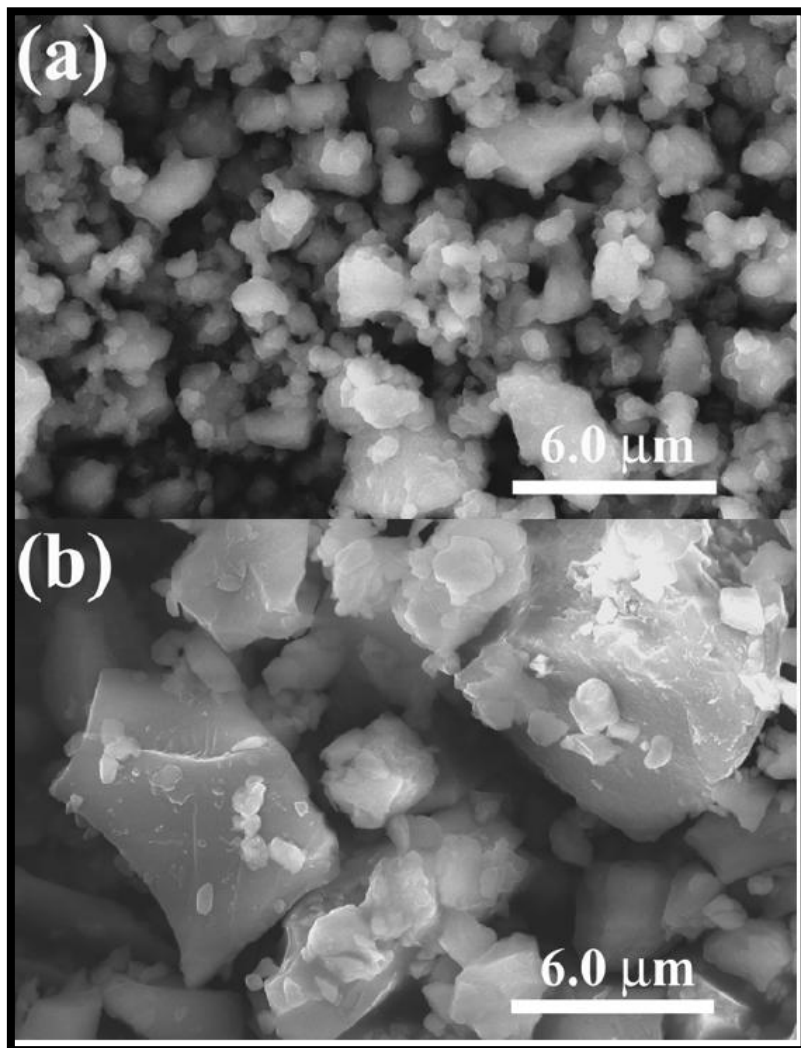


Figura 45. Immagini SEM delle polveri iniziali dei due sistemi di biovetro considerate nel presente lavoro:
(a) **BG_45S5** and (b) **BG_Ca/Mix**

I risultati delle analisi XRD riportati in **Figura 46**, confermano come i due materiali abbiano entrambi una natura amorfa.

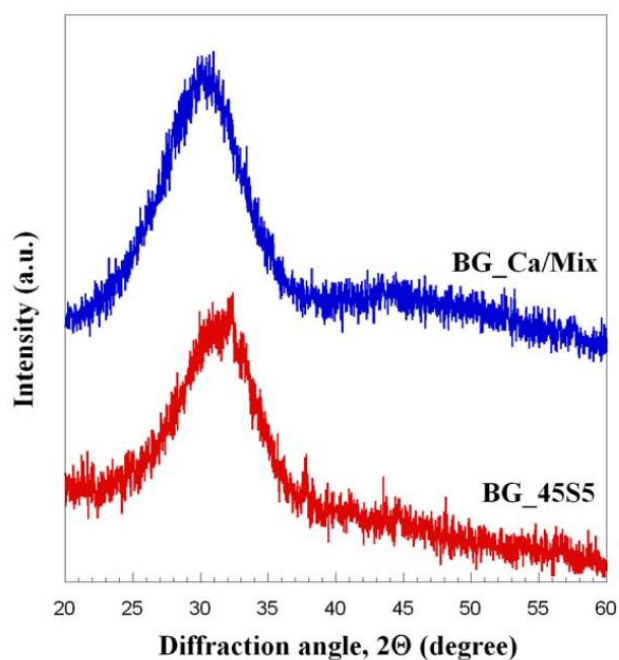


Figura 46. Diffrattogrammi a raggi X delle polveri iniziali dei due sistemi

I risultati relativi alle analisi termiche TGA/DTA per il **BG_45S5**, svolte con temperatura massima di 1000°C e con velocità di riscaldamento di 5, 30 e 50°C/min, sono riportate in **Figura 45 (a)** in funzione della temperatura.

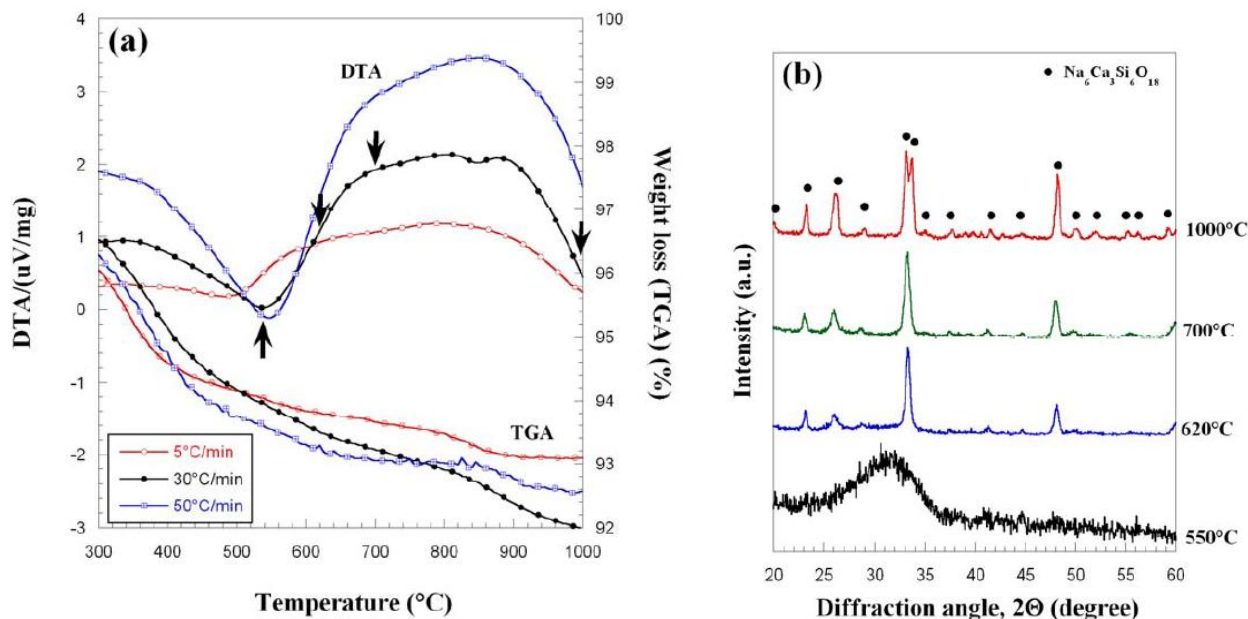


Figura 47. Risultati dell'analisi termica differenziale del biovetro **BG_45S5** in flusso d'aria (100 ml/min): (a) curve TGA/DTA ottenute con diverse velocità di riscaldamento (b) variazioni della composizione (30°C/min)

Per quanto riguarda l'analisi DTA, il picco endotermico derivante dalla transizione vetrosa si ritrova a circa 550°C. Questo aspetto è meglio rilevabile con velocità di riscaldamento più elevate in accordo con quanto descritto in letteratura da [Bretcanu et al., 2009]. Le corrispondenti variazioni composizionali durante questi test sono state monitorate tramite analisi XRD. In **Figura 47(b)** sono stati riportati i risultati ottenuti con una velocità di riscaldamento di 30°C/min. Dati analoghi si ottengono per test eseguiti con altre velocità di riscaldamento. L'analisi XRD delle polveri trattate fino a temperatura di 550°C non hanno messo in evidenza la formazione di fasi cristalline viceversa quando la temperatura viene fatta aumentare fino a 620°C l'analisi DTA mette in evidenza un picco esotermico piuttosto esteso, in corrispondenza del quale l'analisi XRD identifica una nuova fase $\text{Na}_6\text{Ca}_3\text{Si}_6\text{O}_{18}$ (o $\text{Na}_2\text{CaSi}_2\text{O}_6$). La formazione di questa fase cristallina a partire dal biovetro

BG_45S5 è in accordo con quanto riportato in letteratura relativamente a studi analoghi [Boccaccini et al., 2007; Lefebvre et al., 2008; Grasso et al., 2013].

È comunque opportuno notare che in altre pubblicazioni relative al fenomeno di devettrificazione del **BG_45S5** indicano la formazione di, altre fasi quali $\text{Na}_2\text{Ca}_2\text{Si}_3\text{O}_9$ [Filho et al., 1996; Clupper and Hench, 2003; Chen et al., 2012] o $\text{Na}_2\text{CaSi}_3\text{O}_8$ [Porwal et al., 2014].

Queste differenze di comportamento possono dipendere da diversi fattori, come la granulometria delle polveri iniziali, il metodo impiegato per la loro sintesi e le condizioni di trattamento termico adottato [Grasso et al., 2013].

In **Figura 47(b)** viene mostrato come non ci siano ulteriori cambiamenti dal punto di vista compositivo fino a 1000°C. L'unica variazione riguarda l'aumento di intensità e l'assottigliamento dei picchi XRD. Questo fatto può essere attribuito al fenomeno di crescita dei grani cristallini per via della maggiore temperatura raggiunta.

La **Figura 47(a)** mostra una forte diminuzione in peso del campione durante l'analisi TGA, fino ad un valore intorno all'8%. Questa perdita in peso è maggiormente confinata alle basse temperature e può essere associata invece a evaporazione dell'acqua e altri fenomeni di deidrossilazione che hanno luogo prima della cristallizzazione [Boccaccini et al., 2007].

Le **Figure 48(a) e 48(b)** evidenziano come dell'altro sistema, il biovetro, ricco in CaO (**BG_Ca/Mix**) mostri un comportamento significativamente diverso rispetto al **BG_45S5**.

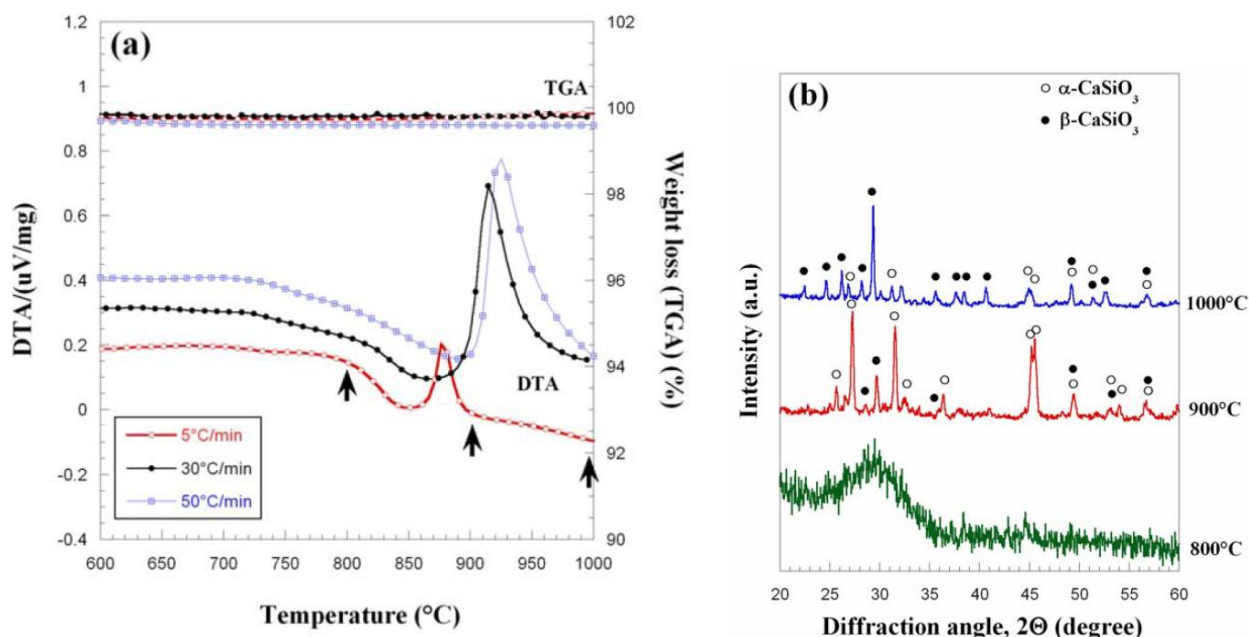


Figura 48. Risultati dell'analisi termica differenziale del biovetro **BG_Ca/Mix**
Flusso d'aria (100 ml/min): (a) curve TGA/DTA ottenute con varie velocità di riscaldamento (b)
variazione della composizione (5 °C/min)

La prima grande differenza riguarda la minore perdita in peso del biovetro, che si attesta intorno all'1% per trattamenti al di sopra dei 1000 °C. Inoltre viene mantenuta la natura amorfa dello stesso fino a di circa 800 °C. Viceversa per le polveri trattate a 900 °C ha luogo la cristallizzazione con la formazione della fase CaSiO_3 presente in due diverse forme, quella α - (pseudo-wollastonite stabile a temperature elevate) e β - (wollastonite cristallina, stabile a basse temperature). Inoltre è stato possibile notare come per temperature oltre i 1000 °C si verifichi la trasformazione della fase α in quella β - CaSiO_3 . La curva derivante dal test DTA mette in evidenza il fatto che quanto il sistema **BG_Ca/Mix** viene riscaldato più velocemente il picco esotermico si sposta a temperature superiori. Questo fenomeno è ben noto in letteratura e può essere sfruttato per stimare l'energia di attivazione del processo di cristallizzazione. In particolare, secondo la teoria di Kissinger [Massera et al.,

2012], dove la temperatura T_p corrispondente al del picco esotermico dipende dalla velocità di

riscaldamento (r) tramite la relazione :
$$\ln\left(\frac{r}{T_p^2}\right) = -\frac{E_c}{RT_p} + C$$

dove R esprime la costante universale dei gas e E_c rappresenta l'energia di attivazione del processo di cristallizzazione. Secondo questa teoria graficando $\ln\left(\frac{r}{T_p^2}\right)$ in funzione di $\frac{1}{T_p}$ si dovrebbe quindi ottenere una retta. Questo è indubbiamente confermato dal grafico di Kissinger mostrato in **Figura 49** dove sono riportati i dati derivanti da velocità di riscaldamento tra 5 e 50°C/min. Attraverso una procedura di regressione lineare è stato quindi possibile stimare E_c ottenendo un valore pari a 520.8 kJ/mol.

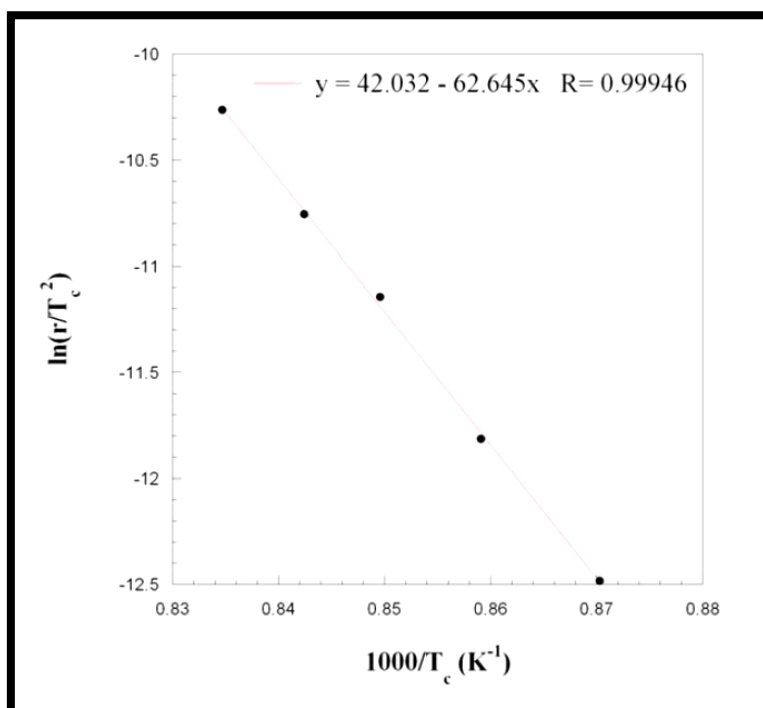


Figura 49. Grafico di Kissinger per il biovetro **BG_Ca/Mix** , basato sui test DTA effettuati a diverse velocità di riscaldamento

Si può notare come il valore ottenuto per **BG_Ca/Mix** sia marcatamente maggiore rispetto a del **BG_45S5** (230-338 kJ/mol) stimato sempre tramite la teoria di Kissinger [Massera et al., 2012].

Quanto trovato è una evidente prova del fatto che il **BG_Ca/Mix** presenta una ridotta tendenza a cristallizzare rispetto al biovetro convenzionale.

3.3.2 Densificazione delle polveri tramite tecnica SPS

Esempi dei cicli termici utilizzati nella sinterizzazione dei due tipi di biovetro sono riportati in **Figura 50**, Unitamente alle curve di densificazione (S) e di velocità di densificazione (SR) in funzione del tempo.

In particolare questi dati si riferiscono alle prove effettuate per entrambi i biovetri nei trattamenti a T_D di 550 e 720°C rispettivamente per i sistemi **BG_45S5** e **BG_Ca/Mix**. Per entrambi i sistemi la velocità di riscaldamento è stata abbassata da 50 a 100°C/min prima del raggiungimento di T_D per limitare il possibile problema dell'overshooting della temperatura rispetto al valore di set-point prestabilito. Infatti, questo fatto potrebbe favorire l'insorgenza di fenomeni di cristallizzazione.

Come è possibile notare dalla **Figura 48(a)** per quanto riguarda il sistema **BG_45S5**, si osserva che la densificazione delle polveri parte già a temperature relativamente basse. La velocità di

densificazione mostra un incremento a partire dai 500°C per raggiungere il suo massimo a 540°C. Alla fine del processo, il campione raggiunge un valore di S pari a 1.6 mm.

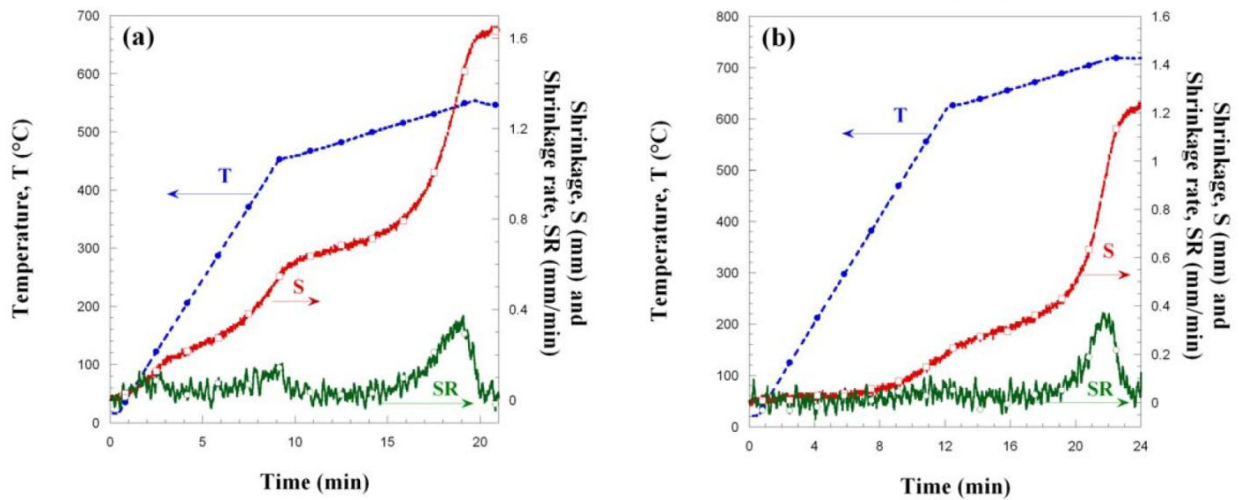


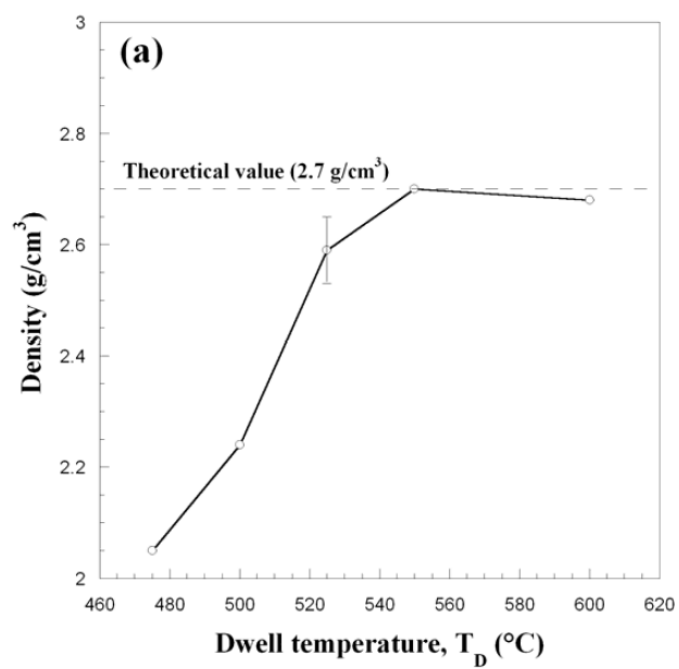
Figura 50. Andamento temporale della temperature di sinterizzazione, del grado di densificazione (S) e della velocità di densificazione (SR) durante il processo di consolidamento delle polveri di (a) **BG_45S5** ($T_D = 550^\circ\text{C}$) e (b) **BG_Ca/Mix** ($T_D = 720^\circ\text{C}$)

Per il sistema **BG_Ca/Mix** (Figura 50(b)) occorrono delle temperature più elevate perchè il consolidamento delle polveri abbia luogo. Infatti, la sinterizzazione è trascurabile fino a circa 450°C durante i primi 8 minuti del processo. L'inizio della sinterizzazione delle polveri è rilevata per temperature intorno ai 680°C con una velocità di densificazione massima a circa 720°C. Il valore di displacement raggiunto a fine test è approssimativamente di 1.2 mm.

In **Figura 51 (a)-(b)** è riportato l'effetto della variazione della temperatura di sinterizzazione sulla densità dei prodotti **BG_45S5** unitamente ai risultati delle analisi XRD.

I dati riportati sono stati ottenuti con un tempo di $t_D = 2$ min e con un carico meccanico di 70MPa.

La **Figura 51(a)** mostra come la densificazione aumenta con l'incremento della temperatura di sinterizzazione. In particolare, il valore di densità teorica, viene raggiunta per la temperatura di 550°C.



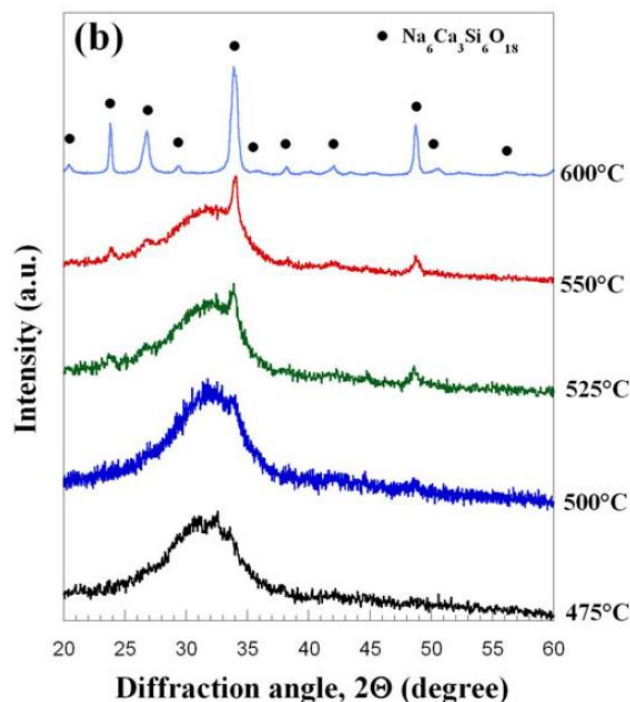


Figura 51(a- b). Influenza della temperatura di sinterizzazione sulla densità dei prodotti (a) relativi al sistema **BG_45S5** ($t_D=2$ min, $P=70$ MPa) e (b) relativi patterns XRD

Quando si incrementa la temperatura di sinterizzazione a 600°C, si riscontra una diminuzione della densità. Le corrispondenti modifiche strutturali sono state dapprima monitorate tramite analisi XRD.

L'incipiente formazione della fase secondaria $\text{Na}_6\text{Ca}_3\text{Si}_6\text{O}_{18}$ è già evidente a 525°C. Malgrado questo, il materiale si presenta prevalentemente amorfo per temperature fino ai 550°C. tuttavia, la caratteristica banda amorfa tende a scomparire come il valore di temperatura raggiunge i 600°C.

Le temperature identificate per l'attivazione del processo di cristallizzazione del biovetro **BG_45S5** sono consistenti con quanto rilevato nelle prove TGA, sebbene nell'analisi termo gravimetrica il sistema non mostra incipiente cristallizzazione fino a 550°C.

Questa discrepanza può essere attribuita alla sostanziale differenza nella rilevazione della temperatura impiegata per trattare termicamente le polveri durante la TGA e i test di sinterizzazione. Infatti, nelle prove in SPS la termocoppia misura la temperatura all'interno del foro ricavato nel portacampioni, quindi non si ha una misura diretta del livello termico delle polveri. Sulla base di queste considerazioni, è possibile affermare che la temperatura misurata durante il processo SPS è sottostimata rispetto a quella realmente raggiunta dal compatto.

È anche importante notare come quanto ottenuto nel presente lavoro riguardo la temperatura di sinterizzazione e cristallizzazione per il sistema **BG_45S5** è in accordo con quanto riportato in letteratura [Grasso et al., 2013].

I cambiamenti strutturali osservati mediante indagini al SEM per questo sistema a valle della sinterizzazione sono riportati in **Figura 52(a-b)**; essi si riferiscono a due campioni ottenuti via SPS a differenti temperature ed attaccati chimicamente sulla superficie tramite acido fluoridrico.

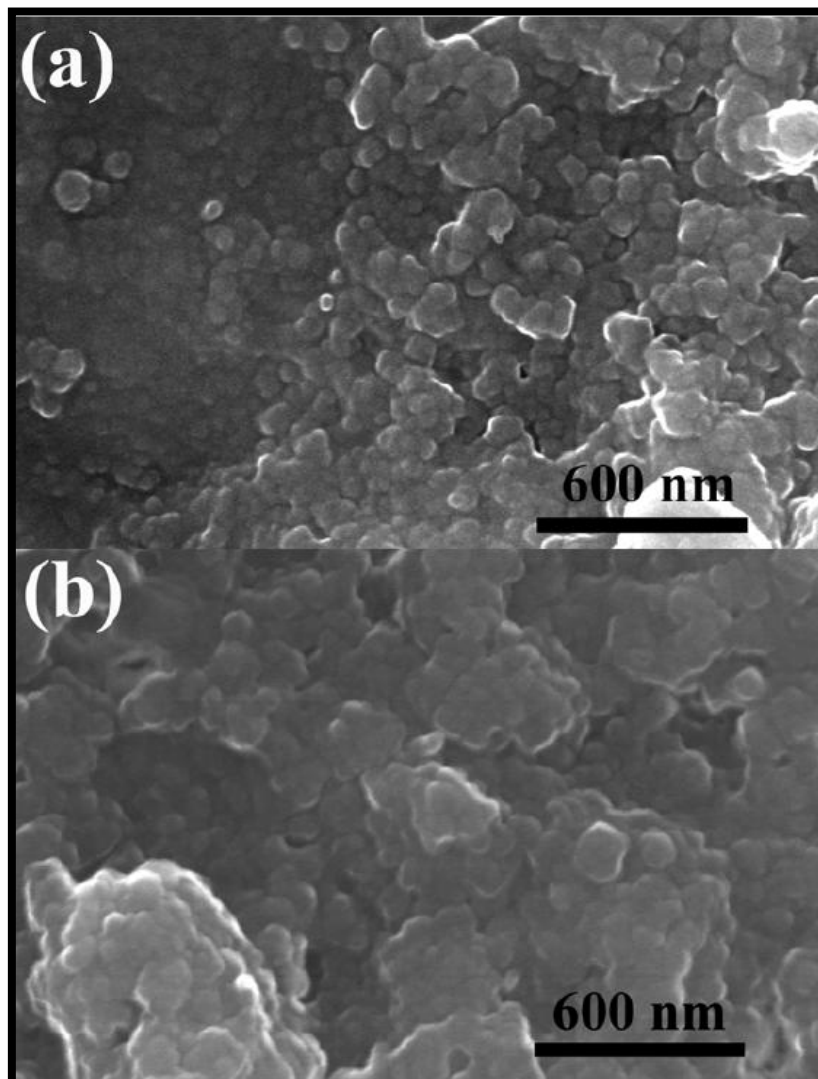


Figura 52(a- b). Immagini SEM di prodotti **BG_45S5** sinterizzati a diverse temperature : (a) 525°C e (b) 600°C

Per il campione ottenuto a 525°C è possibile notare come siano già presenti dei grani di $\text{Na}_6\text{Ca}_3\text{Si}_6\text{O}_{18}$ di dimensione dell'ordine di circa 100nm. Quando la temperatura cresce fino a 600°C, i grani tendono ad aggregarsi, aumentano di dimensione e sostituiscono la matrice amorfa con l'avanzare del processo.

L'effetto del tempo di sinterizzazione sul grado di cristallizzazione e densificazione è stato studiato,

e trattando il sistema alla stessa temperatura 550°C utilizzando però un tempo di permanenza inferiore a 2 min. I risultati ottenuti sono ripostati in **Figura 53**.

La riduzione del tempo di sinterizzazione comporta la diminuzione del fenomeno di cristallizzazione, ma la porosità residua nel campione risulta troppo elevata. In sostanza le condizioni ottimali per la sinterizzazione delle polveri di BG_45S5 sono 550°C, 70MPa e 2 min.

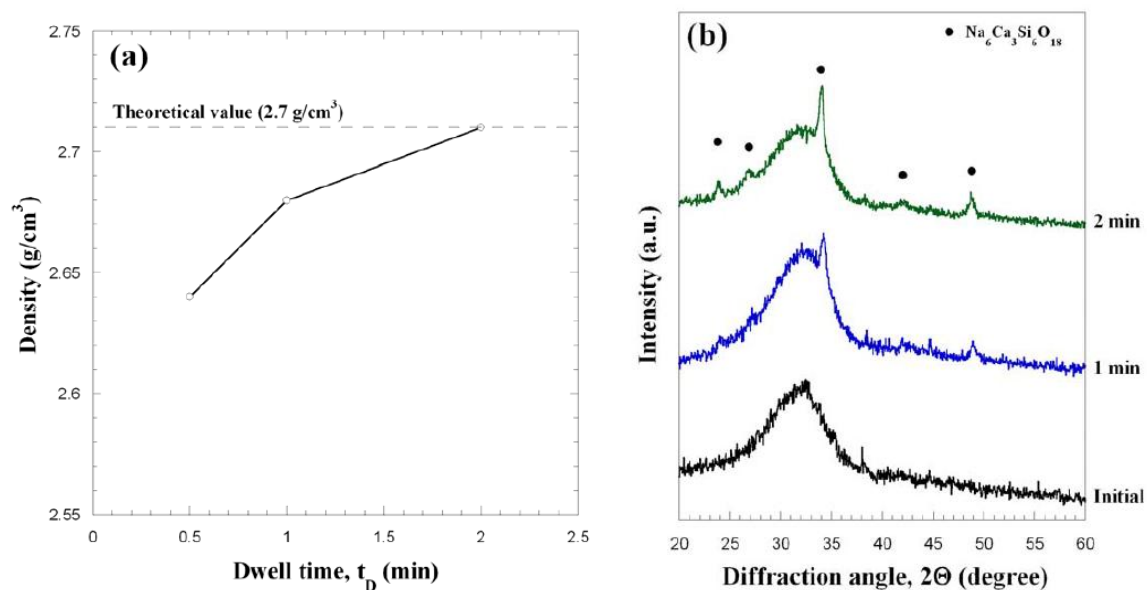


Figura (a- b) 53. Influenza del tempo di sinterizzazione sulla (a) densità dei prodotti a base di BG_45S5 ($T_D=550^\circ\text{C}$, $P=70\text{ MPa}$) e (b) relativi patterns XRD

L'effetto della temperatura di sinterizzazione sulla densità del prodotto e sull'avanzamento del processo di cristallizzazione è stato fatto anche sul biovetro ricco in CaO. I risultati ottenuti sono riportati in **Figura 53(a-b)** per diversi valori di carico meccanico applicato.

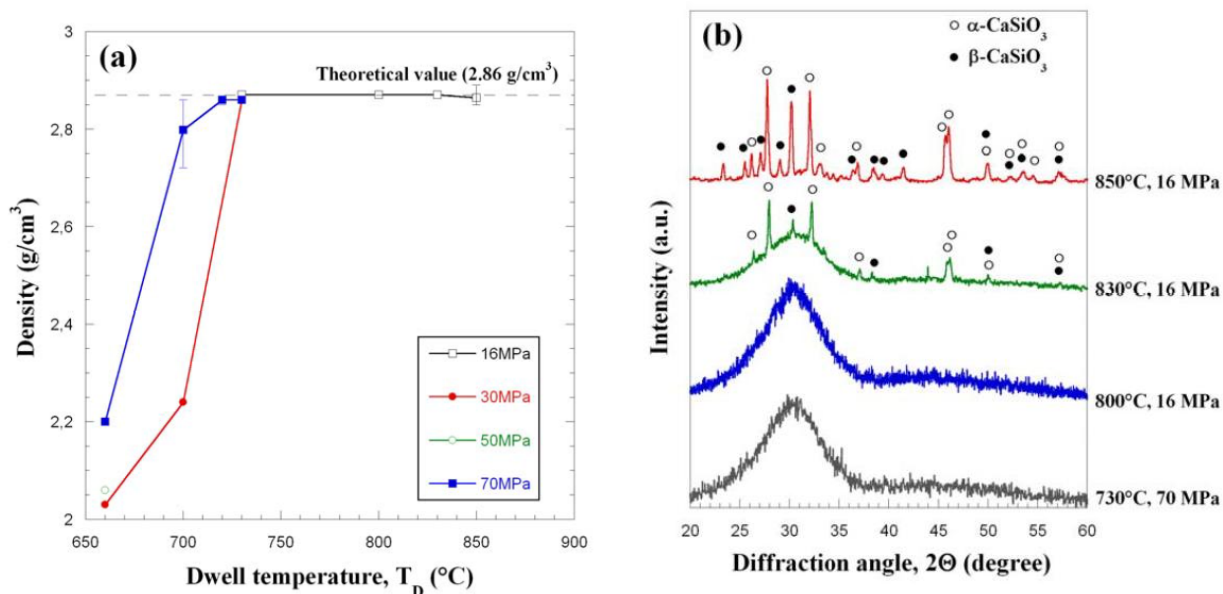


Figura 54(a- b). Influenza della temperature di sinterizzazione e del carico applicato sulla densità (a) dei prodotti del sistema **BG_Ca_Mix** ottenuti mediante SPS ($t_D=2$ min) e (b) relativi patterns XRD

In accordo con quanto mostrato in **Figura 54** è che per la sinterizzazione del sistema **BG_Ca/Mix** sono necessarie delle temperature più elevate rispetto al **BG_45S5**.

Questo risultato è consistente con l'analisi degli output SPS considerata in precedenza. In particolare per l'ottenimento di un prodotto totalmente denso occorrono delle temperature tra 720 e 730°C. In questo caso il sistema densifica senza dar luogo alla la formazione di fasi cristalline secondarie come confermato dai risultati delle prove XRD mostrati in **Figura 54(b)**.

Viene quindi confermata la minore tendenza delle polveri del sistema **BG_Ca/Mix** a cristallizzare, rispetto a quella di **BG_45S5**. Con lo scopo di identificare le condizioni di cristallizzazione per questo sistema innovativo si è proceduto ad aumentare la temperatura di sinterizzazione, mantenendo inalterati gli altri parametri, in particolare la pressione meccanica , contestualmente si è

riscontrata la rottura dei porta campioni. Questo problema è dovuto all'elevato stress termomeccanico a cui erano soggetti i die contenenti le polveri.

Per ridurre questa problematica, i test sono stati svolti riducendo il valore del carico meccanico fino a 16 MPa.

Come mostrato in **Figura 54(a)** la completa densificazione del **BG_Ca/Mix** si ottiene con temperatura 730°C o superiori. Le corrispondenti analisi XRD hanno evidenziato inoltre come non intervenga nessuna cristallizzazione fino a temperatura di 800°C.

Viceversa se si aumenta la temperatura a 830°C la cristallizzazione non ha luogo con la formazione della fase α e β CaSiO₃. Si può notare come a questi livelli termici il carattere amorfo nel materiale sinterizzato venga comunque mantenuto. Procedendo con l'aumento della temperatura a 850°C, la cristallizzazione procede prevalentemente con la formazione della fase β CaSiO₃, mentre la banda amorfa tende a scomparire.

Questo è in accordo con le micrografie SEM riportate in **Figura 55(a)** dove è possibile notare la comparsa di primi cristalli della fase CaSiO₃ iniziano a comparire per il campione sinterizzato a 830°C. Un incremento della temperatura a 850°C comporta una crescita progressiva dei grani della medesima **Figura 55(b)**.

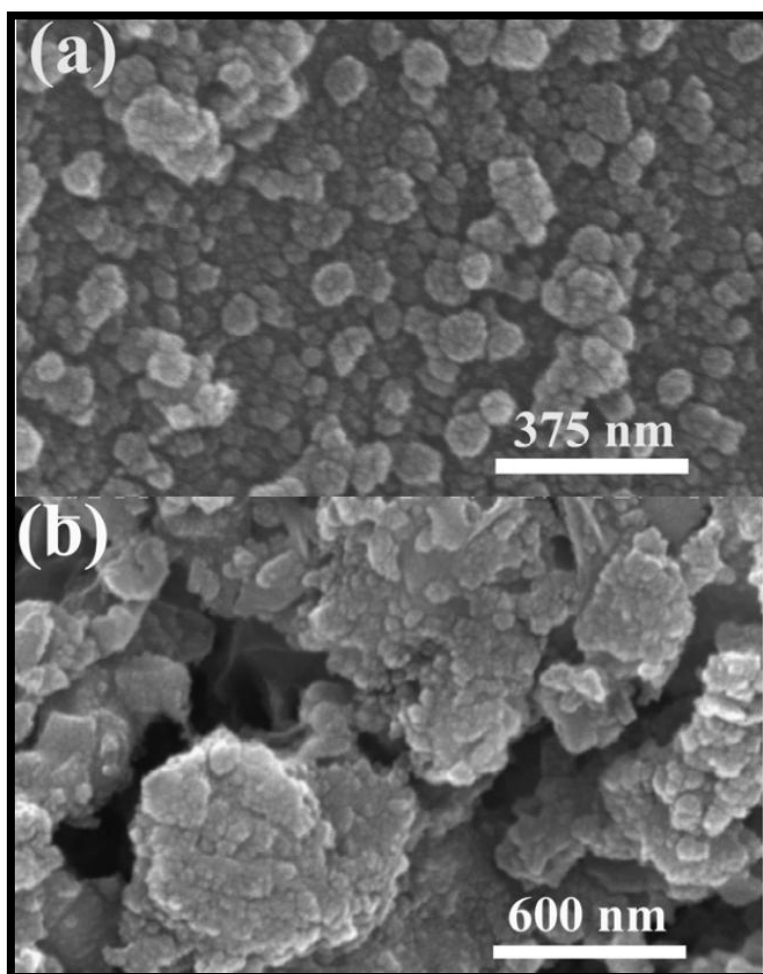


Figura 55(a- b). Immagini SEM dei prodotti **BG_Ca/Mix** sinterizzato a diverse temperature : (a) 830°C/16MPa, e (b) 850°C/16MPa

L'identificazione della temperatura di inizio cristallizzazione di circa 830°C è in accordo con quanto riscontrato durante le prove TGA/DTA.

Molto più importante dal punto di vista applicativo è il fatto che la completa densificazione delle polveri del biovetro **BG_Ca/Mix** si possa ottenere con temperature di 720-730°C, velocità di riscaldamento di 10-50°C e con un tempo di sinterizzazione di 2 minuti. Queste condizioni

operative risultano molto più vantaggiose rispetto a quelle utilizzate nel consolidamento delle stesse polveri mediante sistemi a pressione ambiente [Bellucci et al., 2012].

Si può riassumere quindi che il sistema SPS permette non solo la sinterizzazione in condizioni favorevoli di entrambi i sistemi considerati ma anche di controllare il fenomeno di cristallizzazione. Per quanto riguarda **BG_45S5**, la cristallizzazione non può essere evitata, però il prodotto completamente denso mantiene la sua matrice fondamentalmente amorfa. Viceversa il sistema **BG_Ca/Mix** può essere consolidato mediante SPS ottenendo rapidamente un prodotto totalmente denso e amorfo.

3.4 Caratterizzazioni meccaniche

Le caratterizzazioni meccaniche sono state eseguite con lo scopo di mettere in evidenza l'influenza del processo di cristallizzazione nei biovetri ottenuti via SPS. Allo scopo per ognuna delle due classi sono state scelte due tipologie di materiale che vengono riassunte di seguito:

BG_45S5_a: campione trattato a 550°C, 70MPa, con struttura principalmente amorfa.

BG_45S5_c: campione trattato a 600°C, 70MPa, con struttura principalmente cristallizzata.

BG_Ca/Mix_a: campione trattato a 730°C, 70MPa, con struttura principalmente amorfa.

BG_Ca/Mix_c: campione trattato a 850°C, 16MPa, con struttura principalmente cristallina.

I grafici presenti in **Figure 56(a)** e **(b)**, si riferiscono rispettivamente al modulo elastico ed alla durezza Vickers. Per il materiale a base di **BG_45S5**, si osserva che un aumento di T_D influenza solo marginalmente le proprietà meccaniche.

Comunque i valori ottenuti per **BG_45S5_a** che presenta struttura prevalentemente amorfa sono leggermente più elevati, rispetto al **BG_45S5_c** che possiede un grado di cristallizzazione più elevato. Il fenomeno di devetrificazione dovrebbe avere come conseguenza il miglioramento delle proprietà meccaniche, perché i materiali cristallini sono usualmente più resistenti meccanicamente rispetto ai vetri [Bellucci et al., 2010]. Tuttavia, c'è da tener conto del fatto che lo sviluppo e la crescita della fase cristallina ha inoltre può comportare anche un'importante variazione di volume che si ripercuote in una diminuzione della densità, come peraltro osservato per i campioni **BG_45S5** sinterizzati a 600°C. La riduzione della densità comporta un peggioramento delle proprietà meccaniche. Sulla base di queste considerazioni ed in accordo con quanto riportato in **Figura 54** per i campioni del sistema **BG_45S5** per effetto negativo dato dal riarrangiamento della struttura con conseguente riduzione della densità, è bilanciato da quello positivo dato dalla cristallizzazione. Se si considerano i risultati relativi ai campioni del sistema **BG_Ca/Mix**, si può notare come la durezza Vickers rimane sostanzialmente invariata. (**Figura 54(a)**), mentre il modulo elastico locale aumenta marcatamente con la cristallizzazione (**Figura 54(b)**).

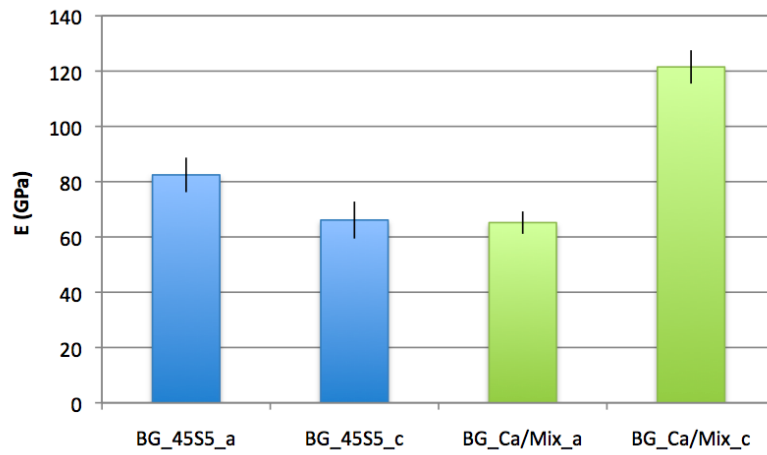


Figura 56(a) Valori di Microdurezza Vickers ottenuti per le due tipologie di campioni di biovetro

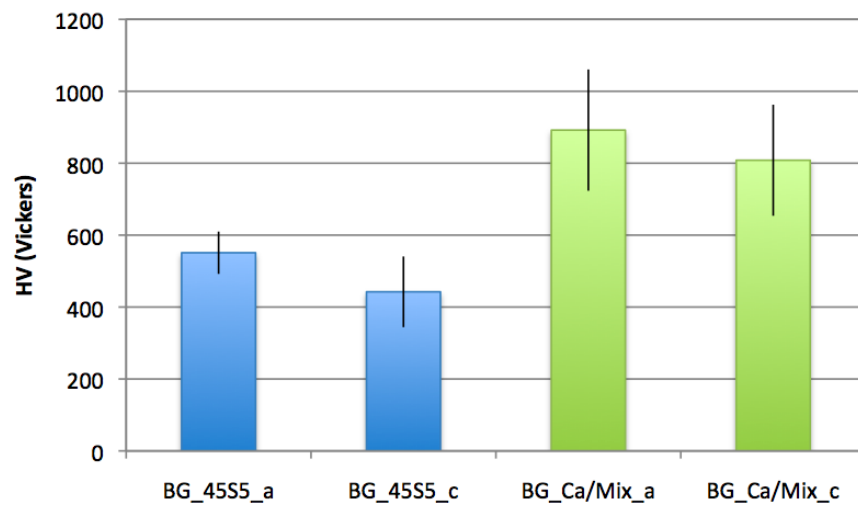


Figura 56(b) Valori del Modulo elastico locale ottenuti per le due tipologie di campioni di biovetro

Questo fatto è probabilmente associato alla differenza fra le proprietà meccaniche del sistema amorfo rispetto alla nuova fase cristallina formatasi, la wollastonite che è caratterizzata da cristalli

di morfologia aciculare, che fungono da rinforzo [Padmanabhan et al., 2013]. Questa fase risulta inoltre avere densità elevata e comunque simile a quella teorica, come osservato per i campioni trattati a 850°C e 16MPa (campione **BG_Ca/Mix_c** mostrato in **Figura 52(a)**).

Indipendentemente dalle considerazioni fatte in precedenza è importante valutare come il biovetro innovativo presenti proprietà meccaniche in genere superiori rispetto a quelle dei biomateriali utilizzati convenzionalmente. Al fine di poter trarre delle conclusioni definitive, occorre tuttavia attendere i risultati relativi al confronto tra i due biovetri in merito alla risposta biologica che si manifesterà quando verranno sottoposti ad opportuni test di bioattività.

Capitolo 4

Caratterizzazione biologica dei sinterizzati a base di idrossiapatite

4.1. BIOCOMPATIBILITÀ

La biocompatibilità rappresenta la caratteristica imprescindibile che deve possedere un impianto o materiale da impianto perché possa essere impiegato per applicazioni biomedicali. Un impianto si dice biocompatibile se, una volta inserito nel tessuto ospite, non induce né subisce effetti avversi significativi [**Williams, 1982**].

Questa proprietà può essere studiata e valutata sotto diversi aspetti che influiscono sulla performance complessiva del materiale. Infatti non si può giudicare ottimo un impianto costituito da materiale resistente meccanicamente, ma non biocompatibile.

La biocompatibilità può essere intesa sotto diversi aspetti. La biocompatibilità dal punto di vista meccanico, tra tessuto ed impianto, che fornisce un'indicazione sull'adeguatezza delle caratteristiche geometriche e meccaniche dell'impianto alla funzione cui è deputato. Questo

significa che l'impianto debba essere non solo robusto, ma anche che il suo inserimento nell'organismo non deve portare a sollecitazioni non anatomiche su altri organi, tali da comprometterne la funzionalità o l'insorgere di nuove patologie. La valutazione della biocompatibilità meccanica di un impianto richiede l'analisi di alcune proprietà che ne definiscono la capacità di resistere alle sollecitazioni.

Per avere una completa biocompatibilità meccanica è necessario che il materiale da impiantare abbia un modulo elastico non troppo diverso da quello del tessuto ospite. La legge di Hooke vale solo per valori dello sforzo applicato in campo elastico ossia inferiori al cosiddetto carico di snervamento, oltre il quale la deformazione del materiale diviene irreversibile (deformazione plastica). Ulteriori modesti incrementi della forza applicata inducono grosse deformazioni, fino a giungere ad un valore del carico che provoca la rottura del materiale (carico di rottura).

Nella scelta di un materiale per impianti in cui la resistenza alle sollecitazioni sia particolarmente critica i parametri sopra citati non risultano sufficienti. Infatti, anche dimensionando l'impianto in modo che gli sforzi a cui deve essere sottoposto si mantengano ben al di sotto del carico di snervamento, esso si può rompere per fatica.

I materiali fragili, come le ceramiche, sono particolarmente esposti al rischio di rottura per fatica tanto da rendere difficile anche la determinazione del loro carico di rottura.

L'effetto della struttura porosa, che concentra il carico su un'area efficace inferiore a quella geometrica, rende questi materiali più adatti a sopportare sforzi di compressione che di trazione. Per migliorarne le caratteristiche meccaniche i materiali ceramici possono essere sottoposti a trattamenti di sinterizzazione, che li rendono più compatti ed omogenei

fino a conferire loro proprietà meccaniche paragonabili a quelle di materiali duttili come l'acciaio.

Questi parametri, assieme ad altri quali la resistenza agli urti e la lavorabilità, consentono di valutare la biocompatibilità meccanica di metalli, leghe e materiali ceramici.

Un'altra importante peculiarità del tessuto osseo dal punto di vista meccanico è la sua anisotropia, in ragione della quale le sue proprietà meccaniche (resistenza, elasticità etc.) dipendono fortemente dall'orientamento della microstruttura dell'osso nei confronti del carico. In particolare l'osso corticale risulta più resistente e rigido longitudinalmente che trasversalmente, dove si presenta sostanzialmente isotropo. Anche supponendo di poter prescindere dal carattere viscoelastico del tessuto osseo e dalla sua anisotropia, nessuno dei materiali attualmente impiegati in chirurgia ortopedica presenta caratteristiche simili a quelle dell'osso corticale. Infatti, i materiali in uso in campo protesico hanno un modulo elastico molto più elevato di quello dell'osso. Quando si procede alla fissazione di elementi metallici all'osso si inducono quindi delle tensioni anomale, che sul lungo termine possono condurre alla rottura o alla mobilizzazione dell'impianto.

Nell'utilizzo di materiali dotati di porosità superficiale, nei quali si sfrutta la crescita di nuovo osso all'interno dei pori al fine di creare un legame più duraturo tra protesi e osso, si deve tenere conto del fatto che l'osso che si forma nei pori di un materiale rigido non essendo adeguatamente caricato non avrà l'affidabilità meccanica dell'osso corticale.

Una delle vie percorse per limitare questo tipo di problemi è quella di interporre tra protesi e impianto uno strato di materiale con caratteristiche meccaniche intermedie, come avviene nel caso dei cementi ossei acrilici. La biocompatibilità dal punto di vista chimico coinvolge i processi

chimici che si instaurano sia a livello locale che sistemico a causa della presenza dell'impianto. È necessario che l'ambiente fisiologico e l'impianto non subiscano modificazioni chimiche tali da compromettere la funzione dello stesso.

La corrosione è uno dei fenomeni di tipo chimico che insorge con maggiore frequenza nei materiali metallici. Le cause di questo fenomeno sono molteplici e dipendono dal materiale utilizzato per l'impianto e dalle sue caratteristiche superficiali; gli effetti prevalenti sono la perdita di consistenza e quindi delle proprietà meccaniche dell'impianto e la dispersione nell'organismo dei prodotti di corrosione.

Il principale tipo di corrosione con cui devono misurarsi i materiali metallici candidati all'impianto è la *corrosione galvanica*. Tale fenomeno, di natura elettrochimica, può svilupparsi ogni volta che si rende possibile il trasferimento di elettroni tra un "polo" che si ossida e cede elettroni (anodo) e quello che si riduce ed acquista elettroni (catodo). Perché il fenomeno possa avvenire con continuità è necessaria l'esistenza di una soluzione elettrolitica che agisca da veicolo per il necessario trasporto ionico. La corrosione galvanica si instaura per differenze di composizione (ossia per la presenza di due poli con un diverso valore di potenziale elettrico), per differenze di concentrazione della soluzione o anche per la presenza di livelli energetici diversi, come accade in caso di distorsioni o tensioni del materiale. Per ovviare a questo fenomeno, che è di tipo superficiale, si effettua la *passivazione* delle superfici mediante deposizione di film di materiali passivanti o, nel caso più semplice, per ossidazione della superficie, fenomeno che in molti casi avviene in parte spontaneamente. Anche i materiali ceramici sono soggetti a fenomeni corrosivi, causati dai differenti livelli energetici presenti al confine tra i granuli di cui sono composti. Questo fenomeno

viene sfruttato per rendere disponibili nel tessuto ospite determinate sostanze. È il caso, ad esempio, di alcune ceramiche calcio fosforo riassorbibili, la cui corrosione per via chimica e biologica dovrebbe favorire la mineralizzazione di osso neoformato.

Per biocompatibilità biologica tra tessuto ed impianto si intende l'assenza di tossicità dell'impianto e l'assenza di reazioni difensive locali o sistemiche generate dall'organismo.

Si può avere una risposta di tipo aspecifico, rappresentata dalla comune reazione da corpo estraneo che determina una prima reazione infiammatoria acuta. La risposta specifica è invece costituita dalla reazione immunologica che l'organismo mette in atto a livello sistemico per difendersi da sostanze tossiche eventualmente presenti nell'impianto. In base a quanto detto sopra riguardo la risposta dell'organismo all'inserimento di un materiale piuttosto che un altro si può fare una distinzione tra i biomateriali:

- bioinerti, se una volta inseriti nel tessuto ospite non subiscono alcuna modificazione né stimolano alcun tipo di risposta nel tessuto circostante;
- bioattivi, se inducono una risposta del tessuto ospite, grazie ad interazioni tra le molecole all'interfaccia tessuto-impianto;
- biodegradabili, se favoriscono una risposta di tipo rigenerativo nel tessuto ospite, venendo gradualmente riassorbiti e sostituiti da tessuto neoformato. In base al tipo di utilizzo per il quale sono destinati, i biomateriali possono venire distinti in due principali categorie: quelli per impianti sostitutivi del tessuto osseo e quelli per impianti protesici. Per gli impianti destinati alla sostituzione d'osso la ricerca è rivolta principalmente allo studio di biomateriali che possano stimolare la rigenerazione tissutale degradandosi poi completamente.

Nel caso di materiali per impianti di tipo protesico, invece, la situazione è esattamente opposta. L'impianto, permanente o temporaneo, dovrà possedere notevoli proprietà meccaniche per garantire la stabilizzazione di fratture o la sostituzione di sezioni di osso, articolazioni distrutte o elementi dentali. Attualmente queste prestazioni sono ottenute tramite metalli, leghe metalliche e, in casi specifici, tramite materiali polimerici o ceramici.

In definitiva è possibile riassumere dicendo che la biocompatibilità riguarda tutti gli aspetti di natura chimica e biologica che possono indurre alterazioni dannose sia per i tessuti naturali, sia per i materiali impiegati per la costruzione dei dispositivi a contatto con tali tessuti **[Pietrabissa, 1996]**.

Solitamente la biocompatibilità viene studiata tramite i test in vitro che vengono effettuati con colture cellulari e permettono di ricavare diverse informazioni riguardo l'interazione tra cellula e biomateriale. È stato definito uno standard, l'ISO 10993-1, ovvero una guida alla selezione dei diversi test di biocompatibilità. Esso basa la scelta dei test di biocompatibilità appropriati alla valutazione di uno specifico materiale, su due fattori principali: le caratteristiche chimiche del materiale stesso e la natura, il grado, la frequenza e la durata dell'esposizione all'organismo una volta impiantato.

Le categorie dei test previsti dalla ISO 10993-1 sono tre: test di citotossicità, di sensibilizzazione e di irritazione o reattività intracutanea. I test di citotossicità possono essere condotti con due modalità. La prima utilizza come mezzo di estrazione le stesse soluzioni fisiologiche usate nella coltura cellulare. La seconda consiste nel porre il campione da esaminare direttamente a contatto

con la coltura cellulare [Carlo di Bello, 2004].

I test di citotossicità comprendono lo studio della proliferazione cellulare, che può essere condotto tramite diversi saggi, come l' **alamarBlue[®] assay**, l'MTT assay, il test di immersione in SBF “*Simulated Body Fluid*”, etc. Per valutare la vitalità delle cellule a contatto con i biomateriali, in questo lavoro di tesi è stato utilizzato l' alamarBlue[®] assay. Successivamente verrà svolto uno studio focalizzato alla rivelazione di tre proteine prodotte dalle cellule tramite l'ELISA Assay, Saggio Immuno-Assorbente legato ad un Enzima (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*). La trattazione e le equazioni che seguono sono tratte dal manuale dell'alamarBlue[®] Assay [<http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals>].

4.2 Test Alamar Blue[®]

Il test dell'alamarBlue[®] è un saggio metabolico che permette di quantificare la proliferazione di cellule animali, batteri e funghi grazie all'incorporazione di un indicatore di ossido-riduzione, che cambia colore e fluorescenza in risposta alla riduzione chimica del terreno di coltura derivante dalla crescita cellulare. Allo stato iniziale l'indicatore redox, la resazurina, si trova nella sua forma ossidata di colore blu e non fluorescente, come indicato in **Figura57** in funzione della riduzione chimica del terreno di crescita dovuta all'attività metabolica cellulare, la resazurina viene convertita nella sua forma ridotta di colore rosso e fluorescente, la resorufina.

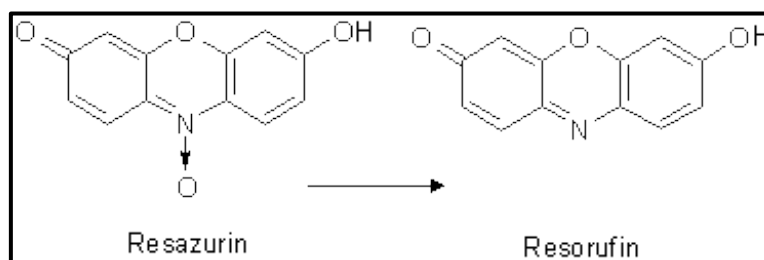


Figura 57. Resazurina convertita alla sua forma ridotta resorufina [<http://rs1.chemie.de/images/4820-75.jpg>].

Questo indicatore redox è stato scelto per diversi motivi. Innanzitutto non è tossico per le cellule e per l'operatore e subisce, in relazione al metabolismo cellulare, una variazione sia colorimetrica (come si può vedere in **Figura 58**) che fluorimetrica e ciò permette di poter scegliere tra diversi metodi di rilevazione. Inoltre questa variazione è chiara, distinta e stabile oltre che di facile interpretazione.

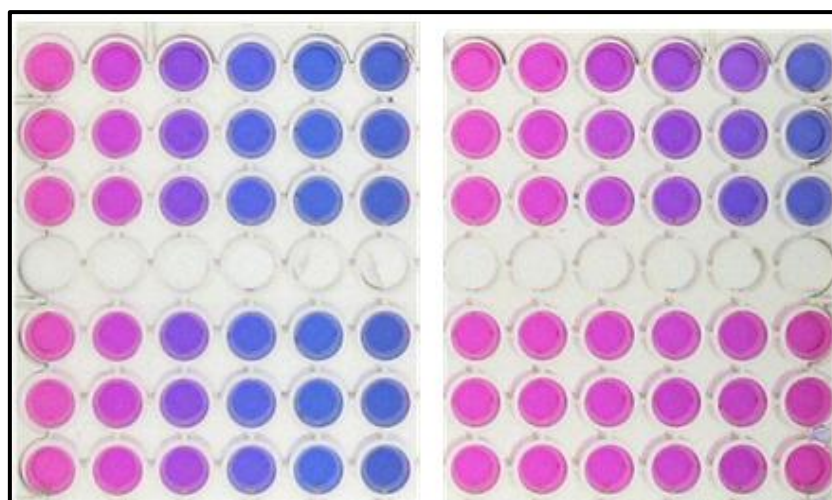


Figura 58. Esempio di una multiwell con diverse variazioni colorimetriche dell' alamarBlue® [<http://grfawblog.files.wordpress.com/2012/04/day5pic1.png>]

I dati dunque possono essere acquisiti rilevando la fluorescenza o l'assorbanza tramite un lettore di

piastre. La fluorescenza è monitorata con un'unica lunghezza d'onda di emissione (590nm) sia per la forma ossidata sia per la ridotta di alamarBlue®. L'assorbanza, invece, è monitorata con due lunghezze d'onda specifiche per le due forme, rispettivamente: 600nm (o 630nm) e 570nm (o 540nm). Infatti come si può vedere in **Figura 56**, i due spettri di assorbanza della forma ossidata e di quella ridotta si sovrappongono per cui, per poter tenere conto di questo, si fa ricorso all'utilizzo di due lunghezze d'onda specifiche per le due forme di alamarBlue®.

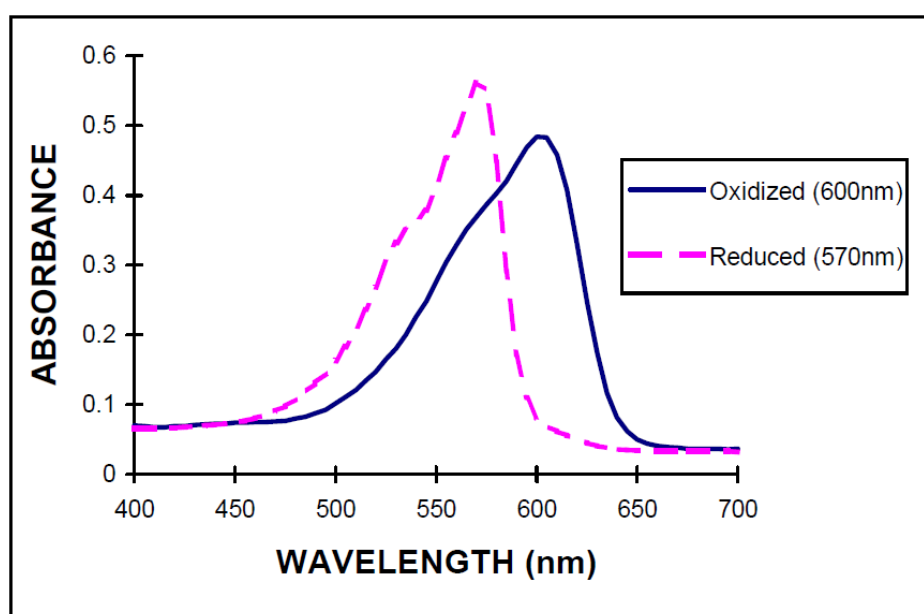


Figura 59. Spettro dell'assorbanza dell' alamarBlue® in forma ossidata e ridotta

Nel nostro studio l'assorbanza è stata misurata con una lunghezza d'onda di 540nm e 630nm. Come schematizzato in **Figura 59**, l' alamarBlue® viene aggiunto sui supporti con le cellule e, dopo un'incubazione di circa 4 ore, si può procedere alla lettura dell'assorbanza o della fluorescenza.

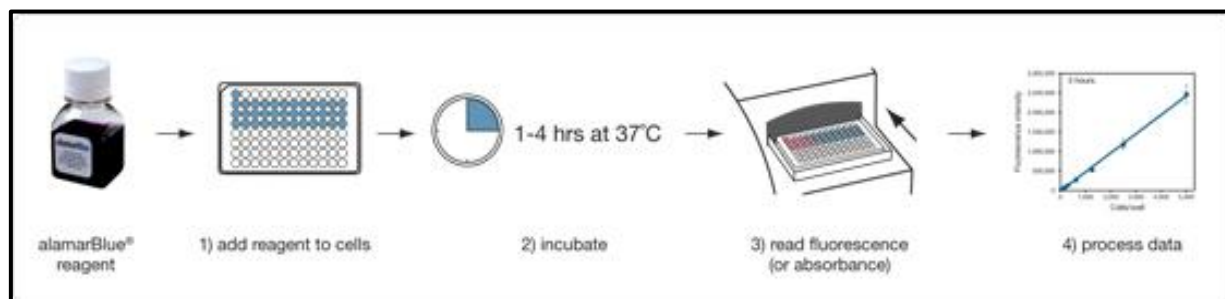


Figura 60. Procedura del test alamarBlue®

[http://www.b2b.invitrogen.com/etc/medialib/en/images/ics_organized/applications/cell_tissue_analysis/data_diagram/560_wide.Par.56113.Image.560.131.1.s005191- alamarBlue®-Schematic-jpg.gif]

I due parametri che influiscono maggiormente sulla risposta delle cellule all' alamarBlue® sono il tempo di incubazione e il numero di cellule. Per questo motivo solitamente viene aggiunta una quantità di alamarBlue® pari al 10% del volume della coltura cellulare. L'assorbanza è direttamente proporzionale al prodotto della concentrazione di alamarBlue® (C_{RED} e C_{OX}) e del coefficiente di estinzione molare (ϵ_{RED} e ϵ_{OX}). Pertanto, l'assorbanza valutata alle due lunghezze d'onda λ_1 e λ_2 sarà rispettivamente pari a:

$$C_{RED} \cdot (\epsilon_{RED})_{\lambda_1} + C_{OX} \cdot (\epsilon_{OX})_{\lambda_1} = A_{\lambda_1} \quad (1)$$

$$C_{RED} \cdot (\epsilon_{RED})_{\lambda_2} + C_{OX} \cdot (\epsilon_{OX})_{\lambda_2} = A_{\lambda_2} \quad (2)$$

I coefficienti di estinzione molare riportati nella seguente **Tabella** sono parametri noti che dipendono dalla lunghezza d'onda:

Lunghezza d'onda (λ)	ϵ_{RED}	ϵ_{OX}
540nm	104395	47619
570nm	155677	80586
600nm	14652	117216
630nm	5494	34798

Dalle espressioni (1)-(2) si possono ricavare le seguenti equazioni:

$$C_{\text{RED}} = \frac{(\epsilon_{\text{OX}})_{\lambda_2} \cdot A_{\lambda_1} - (\epsilon_{\text{OX}})_{\lambda_1} \cdot A_{\lambda_2}}{(\epsilon_{\text{RED}})_{\lambda_1} \cdot (\epsilon_{\text{OX}})_{\lambda_2} - (\epsilon_{\text{RED}})_{\lambda_2} \cdot (\epsilon_{\text{OX}})_{\lambda_1}} \quad (3)$$

$$C_{\text{OX}} = \frac{(\epsilon_{\text{RED}})_{\lambda_1} \cdot A_{\lambda_2} - (\epsilon_{\text{RED}})_{\lambda_2} \cdot A_{\lambda_1}}{(\epsilon_{\text{RED}})_{\lambda_1} \cdot (\epsilon_{\text{OX}})_{\lambda_2} - (\epsilon_{\text{RED}})_{\lambda_2} \cdot (\epsilon_{\text{OX}})_{\lambda_1}} \quad (4)$$

Dalle quali si possono valutare le concentrazioni delle forme ridotta e ossidata dell' alamarBlue[®] noti i valori di assorbanza alle due lunghezze d'onda considerate. Per determinare la percentuale di alamarBlue[®] ridotto si usa la seguente equazione:

$$(\% \text{Riduzione}) = \frac{C_{\text{RED}}[\text{Campioni da Testare}]}{C_{\text{OX}}[\text{Controlli Negativi}]} = \frac{(\epsilon_{\text{OX}})_{\lambda_2} \cdot A_{\lambda_1} - (\epsilon_{\text{OX}})_{\lambda_1} \cdot A_{\lambda_2}}{(\epsilon_{\text{RED}})_{\lambda_1} \cdot A'_{\lambda_2} - (\epsilon_{\text{RED}})_{\lambda_2} \cdot A'_{\lambda_1}} \times 100 \quad (5)$$

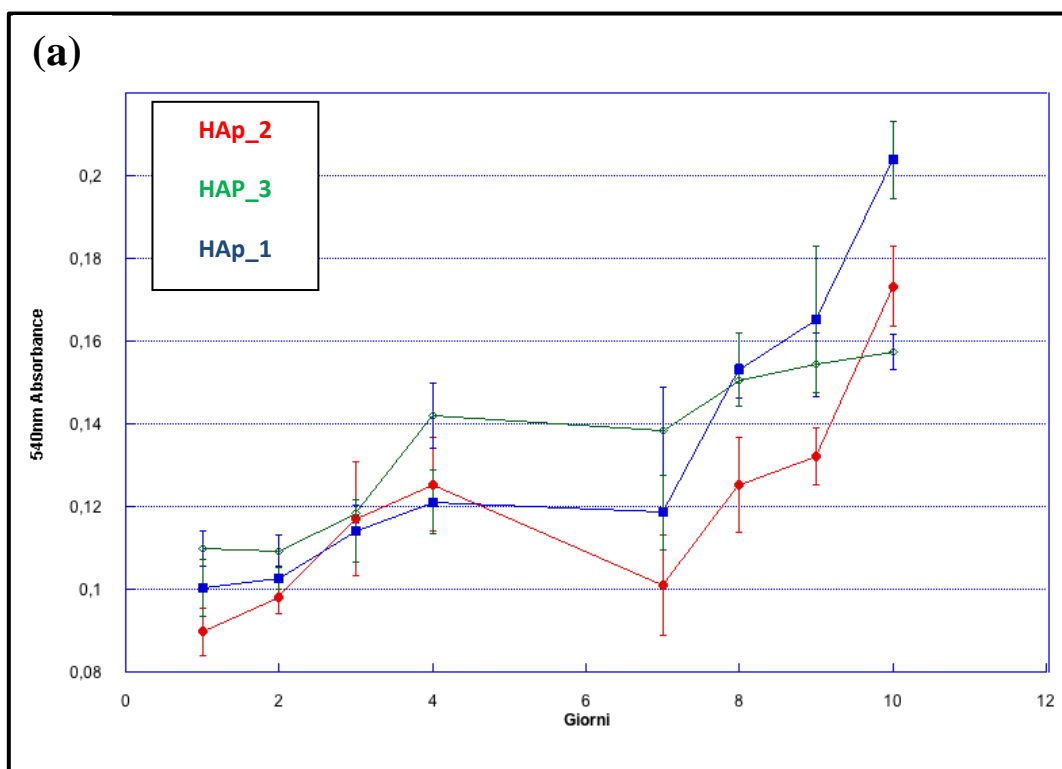
Si precisa che il controllo negativo contiene solo terreno di coltura e alamarBlue[®], che si trova dunque completamente nella forma ossidata. A' rappresenta l'assorbanza dei controlli negativi. Il valore della (%Riduzione) ottenuto dalla eq. (5) fornirà dunque un'indicazione dello stato di benessere delle cellule messe a contatto con i diversi campioni di **HAp**.

4.3 Risultati della caratterizzazione biologica

In questo paragrafo verranno riportati i risultati preliminari riguardanti i test di biocompatibilità effettuati con la procedura alamarBlue[®] sui campioni a base di idrossiapatite sinterizzati mediante SPS nel presente lavoro.

Il test dell' alamarBlue[®] per lo studio della risposta biologica dei campioni **HAp_1**, **HAp_2** e **HAp_3** ha avuto una durata totale di 10 giorni. Infatti, come si osserverà nel seguito, al decimo giorno è stata raggiunta l'overconfluenza delle cellule nel controllo di polistirene. In altre parole a seguito della loro proliferazione le cellule hanno occupato tutta la superficie a disposizione. È opportuno osservare che tale periodo è perfettamente consistente con quanto riportato in letteratura per questa tipologia di test, ma in generale della maggior parte dei test di biocompatibilità, in cui la durata varia dai 3 ai 15 giorni [Guo et al., 2007; Kumar et al., 2013; Baradaran et al., 2014].

Come menzionato nel paragrafo precedente, la misura di assorbanza della percentuale di alamarBlue[®] ridotta è stata effettuata alle due lunghezze d'onda, 540nm e 630nm.



Sono di seguito riportati dapprima i risultati relativi alle letture di assorbanza alle lunghezze d'onda $\lambda_1=540$ nm (**Figura 61(a)**) e $\lambda_2=630$ nm (**Figura 61(b)**) e successivamente verranno mostrati quelli relativi al parametro (% Riduzione).

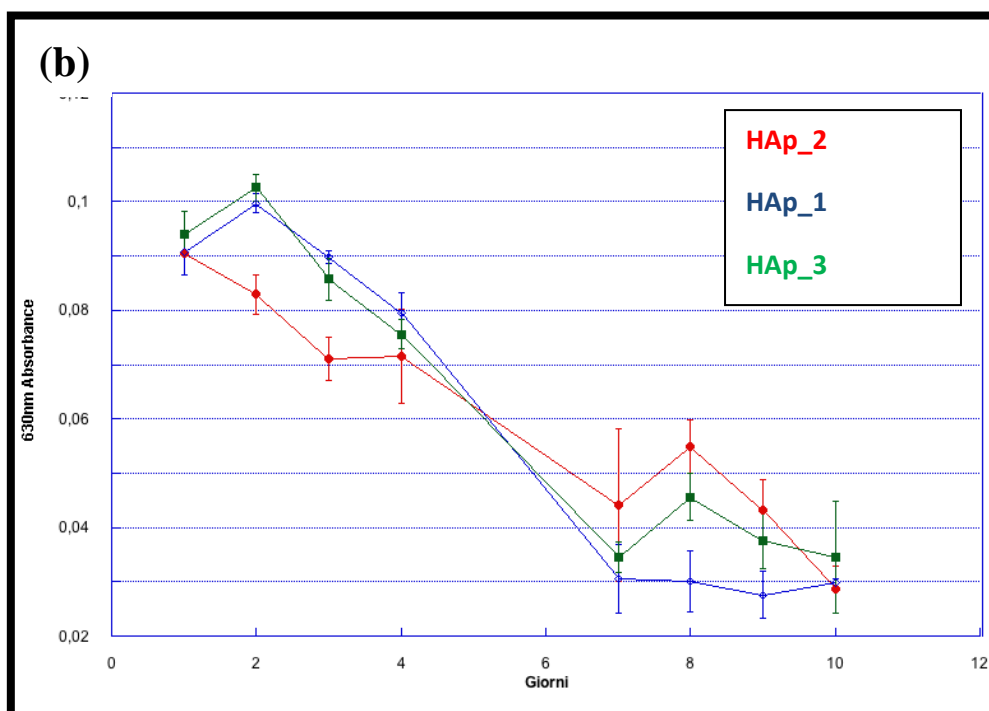


Figura 61. Letture di assorbanza a 540 nm (a) e 630 nm (b) durante i test alamarBlue®

Si può notare come effettuando con la lunghezza d'onda di 630nm si otterrà inizialmente un valore maggiore dell'assorbanza e letture minori nei giorni successivi. Viceversa, misurando l'assorbanza con la lunghezza d'onda di 540nm, si riscontra il minimo al primo giorno e il valore maggiore l'ultimo giorno.

L'andamento di questi grafici è coerente con il fatto che la concentrazione di alamarBlue® nella sua forma ossidata tende a diminuire con il passare del tempo. Mentre quella di alamarBlue® ridotta tende ad aumentare col tempo. Tuttavia, sebbene i grafici precedenti diano un'indicazione del processo di riduzione dell' alamarBlue® come osservato precedentemente essi sono inficiati dalla

sovrapposizione dei segnali di assorbanza. Pertanto la loro corretta interpretazione deve essere fatta utilizzando la formula (3) con la quale è possibile ricavare la percentuale di alamarBlue® ridotta nel tempo per ogni singolo sistema di idrossiapatite. Questo dato rappresenta l'indicatore più significativo per valutare lo stato di benessere cellulare.

La percentuale di riduzione per le tre tipologie di idrossiapatite nel tempo è mostrata in **Figura 62**:

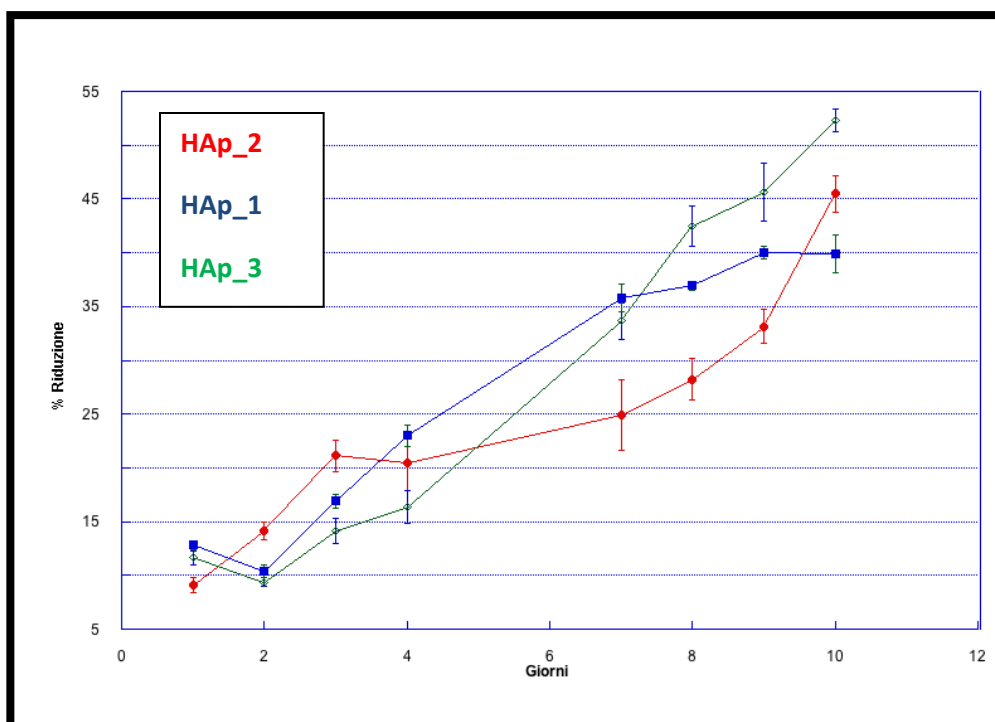


Figura 62. Evoluzione temporale della percentuale di riduzione dell' alamarBlue®.

Dal grafico, si nota come, seppur con differenti dinamiche, le cellule tendono a proliferare già dai primi giorni dalla messa in contatto con i diversi biomateriali. In generale è possibile affermare che tutte le tipologie di idrossiapatite sono in grado di favorire l'adesione e la proliferazione cellulare

anche se la risposta dei tre sistemi è leggermente diversa. Infatti mentre durante i primi 3 giorni il sistema **HAp_2** sembra essere quello con comportamento migliore, nel periodo intermedio (dal 4° al 7° giorno) l'**HAp_3** risulta superiore.

Infine, a partire dall'ottavo giorno, l'**HAp_1** risulta essere il sistema con la percentuale maggiore di alamarBlue® ridotto. Non è ben chiaro se la decomposizione dell'HAp in **β-TCP** per il sistema **HAp_2** giochi un ruolo in questo verso. A tal proposito i dati riportati in letteratura non sono del tutto affidabili. In particolare, in un lavoro recentemente pubblicato in letteratura [Marchi et al, 2013] è stato studiato l'effetto della percentuale di TCP in campioni **HAp-αTCP** sinterizzati nei riguardi della proliferazione di culture cellulari messe a contatto con i diversi materiali.

Il risultato finale mostra come i campioni contenenti una percentuale più alta di TCP sono accompagnati da una maggiore crescita cellulare. Sebbene gli autori attribuiscono questo fatto all'effetto benefico determinato dalla presenza di **β-TCP**, altri aspetti quali porosità e rugosità superficiale dei campioni, piuttosto differenti tra i diversi sistemi confrontati, possono giocare un ruolo rilevante.

Viceversa, nel presente lavoro di tesi il confronto è fatto a parità di grado di porosità (nulla, essendo i campioni completamente densi) e rugosità superficiali (campioni lucidati a specchio).

A tal riguardo, sulla base dei risultati finora ottenuti, i tre sistemi mostrano un comportamento simile e tutti presentano una buona compatibilità a contatto con la coltura cellulare.

Tuttavia, per poter trarre delle conclusioni definitive in merito al sistema HAp da preferire tra i tre

esaminati nel precedente lavoro occorrerà procedere ad altri test di biocompatibilità, come quello in corso, come quello ELISA.

Capitolo 5

Conclusioni

L'identificazione e lo sviluppo di nuovi ceramici che presentino proprietà meccaniche e biologiche superiori rispetto a quelli attualmente impiegati rappresenta una sfida importante nel campo dei materiali da utilizzare per applicazioni biomediche. Tra questi biomateriali i fosfati di calcio, in particolare l'idrossiapatite, ma anche il TCP, e i vetri bioattivi rivestono un ruolo di primo piano in questo conteso. Proprio per questa ragione, queste tipologie di materiali sono state oggetto del presente lavoro di tesi. L'obiettivo generale era innanzitutto confrontare tra loro diversi tipi di polveri disponibili in commercio o innovative per stabilire se fosse possibile identificare una loro scala di preferenza ai fini applicativi.

Un altro aspetto importante era quello di fare ricorso a tecniche di sinterizzazione efficienti come quella SPS affinché, una volta che le polveri iniziali fossero state consolidate per ottenere dei campioni duri, le proprietà originali venissero preservate.

Per quanto riguarda il sistema idrossiapatite, sono state prese in considerazione tre tipologie commerciali di polveri, che, per mezzo di tecnologia SPS, sono state sinterizzate ottenendo dei prodotti ceramici densi. Le polveri iniziali si diversificavano in termini di purezza, granulometria, microstruttura e stabilità chimica e termica.

È stato osservato come queste caratteristiche influenzano il comportamento nel processo di sinterizzazione e le proprietà del prodotto finale. Nello specifico per il sistema **HAp_2** caratterizzato da elevata purezza e da una microstruttura più fine sono state necessarie temperature di sinterizzazione relativamente basse, pari a 900°C. Diversamente da quanto appena affermato, per il sistema **HAp_3**, formato da polveri più grossolane è richiesta una temperatura di 1200°C. Tuttavia, queste condizioni non sono state così estreme da portare alla decomposizione del HAp con formazione della fase secondaria β -TCP.

Viceversa, questa trasformazione chimica è stata invece riscontrata nel sistema **HAp_1**, caratterizzato dalla presenza iniziale di CaHPO_4 come fase secondaria che sinterizza a 1200°C ed il cui prodotto finale presenta β -TCP come fase principale.

Le caratteristiche meccaniche e di trasparenza dei campioni sinterizzati sono risultati strettamente legati alle caratteristiche delle polveri iniziali ed alle condizioni di sinterizzazione utilizzate in particolare i prodotti derivanti da polveri **HAp_2** mostrino maggiore trasparenza, mentre quelli **HAp_1** risultano opachi.

È opportuno osservare che la trasparenza è una caratteristica utile che può essere sfruttata negli studi di biocompatibilità dei campioni in quanto consente di evidenziare meglio lo stato delle cellule a contatto con essi. Il fatto che i campioni **HAp_2** mostrino maggiore trasparenza può essere legato alle dimensioni sub-micrometriche di grani cristallini, a differenza degli altri due sistemi aventi grani di dimensioni maggiori, o come nel caso di **HAp_1** presentino decomposizioni di **HAp**.

I risultati ottenuti dal punto di vista delle proprietà meccaniche sono in linea con quelli riportati in letteratura. Si può riassumere che i campioni **HAp_2** presentino migliori caratteristiche meccaniche mentre quelli **HAp_1** risultino i peggiori in questo senso.

Questo fatto può essere imputato alla decomposizione dell'HAp quindi alla presenza significativa di β -TCP nel prodotto oppure alle maggiori dimensioni dei grani cristallini, come accade nel sistema **HAp_3**.

Tuttavia, dai test preliminari di biocompatibilità è stato possibile mettere in evidenza la buona capacità di tutti i tre sistemi di favorire la proliferazione cellulare sulla superficie del materiale. Questa capacità è stata valutata a parità di caratteristiche quali porosità superficiale (nulla) e grado di rugosità dei campioni testati. Pertanto, l'unica discriminante nella risposta cellulare è valutabile come differenza intrinseca nella composizione e microstruttura del bioceramico sottoposto al test di biocompatibilità.

In questo contesto è risultato fondamentale l'impiego del metodo di sinterizzazione SPS che ha consentito di ottenere molto rapidamente dei campioni densi a base di idrossiapatite da confrontare in termini di proprietà meccaniche e biologiche.

L'altra importante classe di bioceramici considerati nel presente lavoro di tesi sono stati i vetri bioattivi. In particolare sono state prese in considerazione due tipologie di biovetro.

Il primo è stato il 45S5, considerato il capostipite di questa classe di materiali, che possiede delle caratteristiche di bioattività e biocompatibilità indiscusse, condizionate però dalle basse

temperature di cristallizzazione che potrebbero compromettere le proprietà biologiche dello stesso, una volta che le polveri vengono sinterizzate per ottenere prodotti massivi.

L'altro tipo di vetro bioattivo studiato in questo lavoro presenta una composizione innovativa caratterizzata da un maggiore contenuto di ossido di calcio, avente la funzione di inibitore del processo di cristallizzazione, durante la fase di consolidamento.

L'impiego della tecnica SPS ha permesso di sinterizzare entrambe le due tipologie di polveri consentendo un certo controllo del grado di cristallizzazione del materiale in fase di densificazione.

Tuttavia, c'è da fare una distinzione tra i due sistemi che reagiscono al trattamento termico in modo diverso.

Per quanto riguarda il sistema **BG_45S5**, la cristallizzazione non viene evitata se si vuole conseguire la completa densificazione. Ciononostante operando a 550°C è stato possibile ottenere questo materiale in forma densa mantenendo la predominante natura amorfa dello stesso.

Viceversa, per il sistema **BG_Ca/Mix** è stato possibile evitare del tutto il fenomeno di devetrificazione ottenendo campioni completamente densi e amorfi a circa 720°C, mentre sono richieste temperature pari ad almeno 830°C per indurre la cristallizzazione.

Pertanto, dal punto di vista applicativo, è stato messo in evidenza come le due tipologie di biovetro possano essere sinterizzate molto rapidamente mediante la tecnica SPS, limitando o evitando del tutto, il fenomeno di cristallizzazione.

Il biovetro innovativo con una percentuale di ossido di calcio maggiore e la presenza di ossido di potassio, dimostra una minore tendenza a cristallizzare.

I test meccanici hanno messo in evidenza come le proprietà dei due materiali sinterizzati siano buone, in particolare quelle del biovetro innovativo. I dati ottenuti sono incoraggianti per il proseguo sul lavoro di caratterizzazione di queste due tipologie di biovetri dal punto di vista biologico. I risultati ottenuti potrebbero costituire anche una buona base di partenza per l'identificazione di nuovi compositi idrossiapatite-biovetri, la cui combinazione possa portare ad un miglioramento delle caratteristiche meccaniche e biologiche del biomateriale, rispetto a quelle dei singoli componenti.

Riferimenti Bibliografici

S. Baradaran, E. Moghaddam, W.J. Basirun, M. Mehrali, M. Sookhakian, M. Hamdi, M.R. Nakhaei Moghaddam, Y. Alias; Mechanical properties and biomedical applications of a nanotube hydroxyapatite-reduced graphene oxide composite, ScienceDirect, Carbon 69, (2014), 32-45.

Bellucci D., Cannillo V., Sola A. Calcium and potassium addition to facilitate the sintering of bioactive glasses Mater. Lett. 65(12), (2011), 1825-1827.

Bellucci D., Cannillo V., Sola A. A new highly bioactive composite for scaffold applications: A feasibility study Materials 4(2), (2011), 339-354.

Bellucci D., Sola A., Cannillo V. Low temperature sintering of innovative bioactive glasses J. Am. Ceram. Soc. 95(4), (2012), 1313-1319.

Boccaccini A.R., Chen Q., Lefebvre L., Gremillard L., Chevalier, J. Sintering, crystallisation and biodegradation behaviour of Bioglass®-derived glass-ceramics Faraday Discuss. 136, (2007), 27-44.

G.Bolelli,D.Bellucci,V.Cannillo,L.Lusvardi,A.Sola,N.Stiegler,P.Müller,A.Killinger,R.Gadow,L.Altomare,L.DeNardo,Suspension thermal spraying of hydroxyapatite :microstructure and in vitro behaviour, Mater.Sci.Eng.,C34, (2014), 287–303.

Bretcanu O., Chatzistavrou X., Paraskevopoulos K., Conradt R., Thompson I., Boccaccini A.R. Sintering and crystallisation of 45S5 Bioglass® powder J. Eur. Ceram. Soc. 29, (2009), 3299–3306

J. H. Brophy, R. M. Rose e J. Wuff, “The structure and properties of materials” vol 2 “Thermodynamics of structure,” Wiley, 1964, p. 139.

Cha S.I., Hong S.H., Kim B.K., Spark plasma sintering behavior of nanocrystalline WC-10Co cemented carbide powders, *Materials Science and Engineering A* 351, (2003), p. 31.

E.Champion, Sintering of calciumphosphate bioceramics, *ActaBioma- ter.* 9(4), (2013), 5855–5875.
Chen Q.Z., Xu J.L., Yu L.G., Fang X.Y., Khor K.A. Spark plasma sintering of sol-gel derived 45S5 Bioglass® ceramics: Mechanical properties and biocompatibility evaluation *Mater. Sci. Eng. C* 32, (2012), 494–502.

J.Cihlar, A.Buchal, M.Trunec, Kinetics of thermal decomposition of hydroxyapatite bioceramics, *J.Mater.Sci.*34, (1999), 6121–6131.

Clupper D.C., Hench L.L. Crystallization kinetics of tape cast bioactive glass 45S5. *J. Non-Cryst. Solids* 318, (2003), 43–48.

D.J.Curran, T.J.Fleming, M.R.Towler, S.Hampshire, Mechanical parameters of strontium doped hydroxyapatite sintered using microwave and conventional methods, *J.Mech.Behav. Biomed.Mater.*4(8), (2011), 2063–2073.

S.V.Dorozhkin, Bioceramics of calcium orthophosphates, *Biomaterials* 31 (7), (2010), 1465–1485.
S.V.Dorozhkin, Calcium Orthophosphates, *Journal of materials science* 42 (4), (2007), 1061-1095.

M.Eriksson, Y.Liu, J.Hu, L.Gao, M.Nygren, Z.Shen, Transparent hydroxyapatite ceramics with nanograin structure prepared by high pressure spark plasma sintering at the minimized sintering temperature, *J. Eur.Ceram.Soc.*31(9), (2011), 1533–1540.

Filho O.P., LaTorre G.P., Hench L.L. Effect of crystallization on apatite-layer formation of bioactive glass 45S5. *J. Biomed. Mater. Res.* 30, (1996), 509-514.

A.A.Gandhi,R.D.Gunning,K.M.Ryan,S.A.M.Tofail,The role of texturing and densification on optical transmittance of hydroxyapatite ceramics, *J.Am.Ceram.Soc.* 93 (11), (2010), 3773–3777.

Garay J.E., Anselmi-Tamburini U., Munir Z.A., Enhanced growth of intermetallic phases in the Ni-Ti system by current effects, *Acta Materialia* 51(15), (2003), p. 4487.

German R. “Powder Metallurgy Science” seconda edizione, Metal Powder Industry Federation Ed., (1994).

German R. “Sintering Theory and Practice” Wiley-Interscience Ed., (1996).

R.S. Gilmore, J.L. Katz, Elastic properties of apatites, *J.Mater.Sci.* 17 (4), (1982), 1131–1141.

O.A.Graeve, R.Kanakala, A.Madadi, B.C.Williams, K.C.Glass, Luminescence variations in hydroxyapatites doped with Eu²⁺ and Eu³⁺ ions, *Biomaterials* 31(15), (2010), 4259–4267.

Grasso S., Chinnam R.K., Porwal H., Boccaccini A.R., Reece M.J. Low temperature spark plasma sintering of 45S5 Bioglass® *J. Non-Cryst. Solids* 362(1), (2013), 25-29.

Y.W.Gu, N.H.Loh, K.A.Khor, S.B.Tor, P.Cheang, Spark plasma sintering of hydroxyapatite powders, *Biomaterials* 23(1), (2002), 37–43.

Guo X., Gough J., Xiao P., Liu J., Shen Z.; Initial in vitro interaction of human osteoblasts with nanostructured hydroxyapatite (NHA); *Advances in Bioceramics and Biocomposites II*; 2007

Guo H.B, Miao X., Chen Y., Cheang P., Khor K.A. Characterization of hydroxyapatite- and bioglass-316L fibre composites prepared by Spark Plasma Sintering *Mater. Lett.* 58, (2004), 304–307.

X.Guo, P.Xiao, J.Liu, Z.Shen, Fabrication of nanostructured hydroxyapatite via hydrothermal

synthesis and spark plasma sintering, *J. Am.Ceram.Soc.*88, (2005), 1026–1029.

X.Guo,J.E.Gough,P.Xiao,J.Liu,Z.Shen,Fabrication of nanostructured hydroxyapatite and analysis of human osteoblastic cellular response, *J.Biomed.Mater.Res.A*82(4), (2007), 1022–1032.

L. L. Hench, “The story of Bioglass® ”, *J. Mater. Sci: Mater. Med.*, 17, (2006), 967-978.

L. L. Hench, J. M. Polak, *Third-Generation Biomedical Materials*, Science 295, (2002), 1014.

L.L. Hench, *Bioceramics: From concept to clinic*. *J. Am. Ceram. Soc.*, 74, (1991), 1487-1510.

Lockyer M. W. G., Holland D., Dupree R., NMR investigation of the structure of some bioactive and related glasses, *Journal of Non-Crystalline Solids* 188, (1995), 207-219.

B.N. Kim, E.Prajatelistia, Y.H.Han, H.W.Son,Y.Sakka, S.Kim, Transparent hydroxyapatite ceramics consolidated by spark plasma sintering, *Scr.Mater.*69(5), (2013), 366–369.

Kokubo Ed. T., “*Bioceramics and their clinical applications*”, Woodhead Publishing Ltd, 2008

Kumar A, Webster TJ, Biswas K, Basu B. 2013. Flow cytometry analysis of human fetal osteoblast fate processes on spark plasma sintered hydroxyapatite–titanium biocomposites. *J Biomed Mater Res Part A*:101A, (2013), 2925–2938.

R. Kumar,P.Cheang,K.A.Khor, Spark plasma sintering and in vitro study of ultra-fine HAandZrO₂–HA powders, *J.Mater.Process. Technol.* 140, (2003), 420–425.

Lefebvre, L., Gremillard, L., Chevalier, J., Zenati, R., Bernache-Assolant, D.Sintering behaviour of 45S5 bioactive glass. *Acta Biomaterialia* 4(6) (2008) 1894-1903.

Li P., Yang Q., Zhang F., Kokubo T. The effect of residual glassy phase in a bioactive glass ceramic on the formation of its surface apatite layer in vitro *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 3, (1992) 452-456.

- Locci A.M., Orrù R., Cao G., Munir Z.A. Effect of ball milling on simultaneous spark plasma synthesis and densification of TiC-TiB₂ composites. *Mat. Sci. Eng. A* 434(1-2) (2006) 23-29.
- Lockyer M.W.G., Holland D., Dupree R. NMR investigation of the structure of some bioactive and related glasses, *J. Non-Cryst. Solids* 188, (1995), 207-219.
- B.T. Lee, N.Y. Shin, J.K. Han, H.Y. Song, Microstructures and fracture characteristics of spark plasma-sintered HAp-5vol% Ag composites, *Mater. Sci. Eng.*, A429, (1-2), (2006), 348-352.
- H. Li, K.A. Khor, V. Chow, P. Cheang, Nanostructural characteristics, mechanical properties, and osteoblast response of spark plasma sintered hydroxyapatite, *J. Biomed. Mater. Res.* A82(2), (2007), 296-303.
- C.-J. Liao, F.-H. Lin, K.-S. Chen, J.-S. Sun, Thermal decomposition and reconstitution of hydroxyapatite in atmosphere, *Biomaterials* 20(19), (1999), 1807-1813.
- Y. Liu, Z. Shen, Dehydroxylation of hydroxyapatite in dense bulk ceramics sintered by spark plasma sintering, *J. Eur. Ceram. Soc.* 32 (11), (2012), 2691-2696.
- Lowenstam HA, Weiner S *On Biomineralization*. Oxford University Press, New York, (1989).
- Massera J., Fagerlund S., Hupa L., Hupa M. Crystallization mechanism of the bioactive glasses, 45S5 and S53P4 *J. Am. Ceram. Soc.* 95(2), (2012), 607-613
- Yu. V. Milman, A. A. Golubenko, S. N. Dub, Indentation size effect in nano hardness, *Acta Mater.* 59(20), (2011), 7480-7487.
- A. Nakahira, M. Tamai, H. Aritani, S. Nakamura, K. Yamashita, Biocompatibility of dense hydroxyapatite prepared using an SPS process, *J. Biomed. Mater. Res.* 62(4), (2002), 550-557.
- W.C. Oliver, G.M. Pharr, An Improved Technique for determining hardness and elastic modulus using load and displacement sensing indentation experiments, *J. Mater. Res.* 7(6), (1992), 1564-1583.

Omori M., Sintering, consolidation, reaction and crystal growth by the spark plasma system, *Materials Science and Engineering A* 287, (2000), p. 183.

Orrù R., Licheri R., Locci A.M., Cincotti A., Cao G., Consolidation/Synthesis of Materials by Electric Current Activated/Assisted Sintering, *Materials Science and Engineering Report* 63(4-6), (2009), p. 127-287.

M.Omori, T.Onoki, T.Hashida, A.Okubo, Y.Murakami, Low temperature synthesis of hydroxyapatite from $\text{CaHPO}_4 - 2\text{H}_2\text{O}$ and $\text{Ca}(\text{OH})_2$ based on effect of the sparkplasma system (SPS), *Ceram.Int.* 32 (6) (2006), 617–621.

Padmanabhan S.K., Gervaso F., Carrozzo M., Scalera F., Sannino A., Licciulli A.,

Wollastonite/hydroxyapatite scaffolds with improved mechanical, bioactive and biodegradable properties for bone tissue engineering *Ceram Int* 39 (2013) 619-627.

Porwal H., Grasso S., Cordero-Arias L., Li C., Boccaccini A.R., Reece M.J. Processing and bioactivity of 45S5 Bioglass®-graphene nanoplatelets composites *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 25(6), (2014), 1403-1413.

S.Raynaud, E.Champion, D.Bernache-Assollant, P.Thomas, Calcium phosphate apatites with variable Ca/P atomic ratio I.Synthesis, characterisation and thermal stability of powders, *Biomaterials* 23(4), (2002), 1065–1072.

S.Ramesh, K.L.Aw, R.Tolouei, M.Amiriyan, C.Y.Tan, M.Hamdi, J. Purbolaksono, M.A.Hassan, W.D.Teng, Sintering properties of hydroxyapatite powders prepared using different methods, *Ceram.Int.* 39, (2013), 111–119.

Ruiz-Hitzky, E., Ariga, K., Lvov, Y.M., *Bio-inorganic Hybrid Nanomaterials, Strategies, Syntheses, Characterization and Applications*, 2008.

Y.Watanabe,T.Ikoma,A.Monkawa,Y.Suetsugu,H.Yamada,J.Tanaka, Y. Moriyoshi, Fabrication of transparent hydroxyapatite sintered body with high crystalorientation by pulse electric current sintering,J.Am.Ceram.Soc. 88 (1), (2005), 243–245.

Weiner S, Wagner HD The material bone: Structure-mechanical function relations. Annual Rev Mat Sci (1998), 28:271-298.

Williams D.F. Biocompatibility of orthopedic implants., CRC Press, Boca Raton, Florida, (1), (1982).

J.L.Xu, K.A.Khor, R.Kumar, Physicochemical differences after densifying radio frequency plasma sprayed hydroxyapatite powder susing spark plasma and conventional sintering techniques, Mater.Sci.Eng.,A 457 (1–2), (2007), 24–32.